

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
des Kindes- und Jugendalters
LVR-Klinikum Essen

**Molekulargenetische Analyse am GWAS-basierten
Adipositaskandidatengen *TUFM*
(*Tu translation elongation factor mitochondrial gene*)
bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Christoph Struve
aus Kiel
2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. A. Hinney

2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. Grasemann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2017

Publikationen

Manuskripte:

Volckmar, A.-L., Song, J.-Y., Jarick, I., Pütter, C., Göbel, M., Horn, L., **Struve, C.**, Haas, K., Knoll, N., Grallert, H., Illig, T., Reinehr, T., Wang, H.-J., Hebebrand, J., Hinney, A. (2015): Fine Mapping of a GWAS-Derived Obesity Candidate Region on Chromosome 16p11.2. PLoS ONE. 10, e0125660

Volckmar, A.L., Han, C.T., Pütter, C., Haas, S., Vogel, C.I., Knoll, N., **Struve, C.**, Göbel, M., Haas, K., Herrfurth, N., Jarick, I., Grallert, H., Schürmann, A., Al-Hasani, H., Hebebrand, J., Sauer, S., Hinney, A. (2016): Analysis of Genes Involved in Body Weight Regulation by Targeted Re-Sequencing. PLoS ONE. 11, e0147904

Abstracts für Kongresse:

Volckmar, A.-L., Song, J.-Y., Jarick, I., Pütter, C., Göbel, M., Horn, L., **Struve, C.**, Haas, K., Knoll, N., Grallert, H., Illig, T., Reinehr, T., Wang, H.-J., Hebebrand, J., Hinney, A. (2015): Fine Mapping of a GWAS-Derived Obesity Candidate Region on Chromosome 16p11.2. Abstract auf dem 22ten European Congress on Obesity in Prag (ECO2015)

Struve, C., Göbel, M., Knoll, N., Volckmar, A.-L., Hebebrand, J., Hinney, A. (2012): Tu translation elongation factor mitochondrial gene (TUFM): mutation screen in extremely obese children and adolescents. Abstract und Postervorstellung auf dem Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen 2012

Inhalt

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Adipositas..... | 5 |
| 1.1 | Einleitung | 5 |
| 1.2 | Definition und Klassifikation..... | 5 |
| 1.3 | Epidemiologie: Prävalenz, Morbidität und Mortalität | 8 |
| 1.3.1 | Prävalenz..... | 8 |
| 1.3.2 | Morbidität..... | 9 |
| 1.3.3 | Mortalität..... | 9 |
| 1.4 | Umweltbedingte Aspekte der Adipositas | 9 |
| 1.4.1 | Umweltbedingte Aspekte | 10 |
| 1.4.1.1 | Medizinische Aspekte..... | 10 |
| 1.5 | Regulation des Körpergewichts | 10 |
| 1.5.1 | Zentralnervöse Regelkreise | 11 |
| 1.5.1.1 | Anorexigene Neurotransmitter..... | 11 |
| 1.5.1.2 | Orexigene Neurotransmitter | 12 |
| 1.5.2 | Periphere Regelkreise | 12 |
| 1.5.2.1 | Kurzfristige Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung | 12 |
| 1.5.2.2 | Langfristige Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung | 13 |
| 1.5.3 | Mitochondrien | 13 |
| 1.6 | Genetische Aspekte | 14 |
| 1.6.1 | Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien | 14 |
| 1.6.2 | Syndromale Formen der Adipositas beim Menschen | 14 |
| 1.6.3 | Molekulargenetische Verfahren in der Adipositas-Forschung..... | 15 |
| 1.6.3.1 | Kandidatengenansatz..... | 15 |
| 1.6.3.2 | Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)..... | 15 |
| 1.6.4 | Monogene Formen der Adipositas und die Rolle des Leptin-Melanocortin-Regelkreises..... | 16 |
| 1.6.5 | Polygene Formen der Adipositas | 17 |
| 1.6.6 | GWAS und ihr Beitrag zur Identifikation möglicher Kandidatengene für die Entstehung von Adipositas..... | 18 |
| 1.7 | Die chromosomale Region 16p11.2 | 20 |
| 1.7.1 | <i>SH2B1</i> als Kandidatengen für Adipositas..... | 20 |
| 1.7.2 | <i>TUFM</i> als Kandidatengen für Adipositas..... | 20 |
| 1.7.2.1 | Eigenschaften von <i>TUFM</i> | 20 |
| 1.7.2.2 | Eignung als Kandidatengen und aktueller Forschungsstand | 21 |
| 1.8 | Ziele der Arbeit..... | 23 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2 | Material und Methoden..... | 24 |
| 2.1 | Probandenkollektiv | 24 |
| 2.1.1 | Kriterien zur Teilnahme an der Studiengruppe | 24 |
| 2.1.2 | Deskriptive Statistik | 24 |
| 2.2 | Geräte und Chemikalien..... | 25 |
| 2.2.1 | Geräte | 25 |
| 2.2.2 | Chemikalien | 26 |
| 2.2.3 | Puffer..... | 28 |
| 2.2.3.1 | Puffer für die DNA-Extraktion | 28 |
| 2.2.3.2 | Standardpuffer | 28 |
| 2.2.4 | Puffer für die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC, Wave®) | 28 |
| 2.2.5 | Chemikalien für die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP) | 29 |
| 2.2.6 | Enzyme für den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)..... | 30 |
| 2.3 | Eigenanteil an der vorliegenden Arbeit | 30 |
| 2.4 | Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) | 31 |
| 2.5 | Polymerase-Kettenreaktion zur in-vitro Amplifizierung der DNA | 32 |
| 2.5.1 | Durchführung einer PCR..... | 32 |
| 2.5.2 | PCRs für das <i>TUFM</i> -Gen..... | 33 |
| 2.5.2.1 | Design der Primer | 33 |
| 2.5.2.2 | Mg ²⁺ -Konzentration in einer PCR | 33 |
| 2.5.3 | PCR-Protokolle für die Durchführung dieser Arbeit | 34 |
| 2.6 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 35 |
| 2.6.1 | Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese..... | 35 |
| 2.7 | Methoden des Mutationsscreenings | 36 |
| 2.7.1 | Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP)..... | 36 |
| 2.7.1.1 | Durchführung der SSCP bei <i>TUFM</i> | 36 |
| 2.7.2 | Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie | 38 |
| 2.7.2.1 | Durchführung der dHPLC bei <i>TUFM</i> | 40 |
| 2.7.3 | DNA-Sequenzierung nach Sanger | 41 |
| 2.7.3.1 | Durchführung der Sanger-Sequenzierung bei <i>TUFM</i> | 41 |
| 2.8 | Methoden der Genotypisierung | 42 |
| 2.8.1 | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) | 42 |
| 2.8.1.1 | Durchführung der RFLPs bei <i>TUFM</i> für die Varianten rs61737565 und rs4788099 | 42 |
| 2.8.2 | Tetra-primer ARMS-PCR | 44 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.8.2.1 | Durchführung der Tetra-ARMS-PCR bei <i>TUFM</i> Exon 3 für die Variante rs8061877 | 45 |
| 2.9 | Statistische Auswertung | 46 |
| 2.9.1 | Hardy-Weinberg-Gleichgewicht | 46 |
| 2.9.2 | Annahmen und Statistische Tests..... | 47 |
| 2.9.2.1 | Der exakte Test nach Fisher (Fisher's Exact Test) | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Mutationsscreening | 50 |
| 3.1.1 | Sequenzvarianten in Exon 3 | 52 |
| 3.1.1.1 | Intronische Variante rs8061877 (C>T) in <i>TUFM</i> | 52 |
| 3.1.2 | Sequenzvarianten in den Exons 6 und 7..... | 53 |
| 3.1.2.1 | Intronische Variante rs61737565 (G>C) in <i>TUFM</i> | 54 |
| 3.1.2.2 | Intronische Variante rs4788099 (A>G) in <i>TUFM</i> | 55 |
| 3.2 | Genotypisierung | 56 |
| 3.2.1 | ARMS-PCR für rs8061877 (Exon 3) in <i>TUFM</i> | 56 |
| 3.2.2 | RFLP für rs61737565 und rs4788099 (Exon 7) in <i>TUFM</i> | 57 |
| 3.2.3 | Genotypverteilung und Vergleich der Fall- mit der Kontrollgruppe | 58 |
| 3.3 | <i>In silico</i> Analysen | 59 |
| 3.4 | Nachfolgende Arbeiten | 60 |
| 4 | Diskussion..... | 61 |
| 4.1 | Das Kandidatengen <i>TUFM</i> | 61 |
| 4.1.1 | Die gefundenen SNPs rs8061877, rs61737565 und rs4788099..... | 61 |
| 4.2 | Auswahl des Probandenkollektivs | 63 |
| 4.3 | Methoden des Mutationsscreenings | 63 |
| 4.3.1 | PCR..... | 63 |
| 4.3.2 | SSCP..... | 64 |
| 4.3.3 | dHPLC | 64 |
| 4.3.4 | Sequenzierung | 64 |
| 4.4 | Methoden der Genotypisierung | 65 |
| 4.4.1 | ARMS-PCR | 65 |
| 4.4.2 | RFLP | 65 |
| 4.5 | Validität und Reliabilität der Ergebnisse | 66 |
| 4.6 | Post-GWAS-Zeitalter..... | 66 |
| 4.7 | Zusammenfassende Beurteilung..... | 67 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 68 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 69 |
| 7 | Anhang..... | 91 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 7.1 | Verwendete Sequenz von <i>TUFM</i> und Primerpositionen | 91 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis..... | 94 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis..... | 97 |
| 7.4 | Abkürzungsverzeichnis | 99 |
| 8 | Danksagung | 101 |
| 9 | Lebenslauf..... | 102 |

1 Adipositas

1.1 Einleitung

Adipositas bezeichnet eine chronische Störung, die mit extremem Übergewicht, eingeschränkter Lebensqualität, psychischer und physischer Morbidität und erhöhter Mortalität einhergeht (WHO 2016). Die medizinischen Kosten für Adipositas mit Folgeerkrankungen wurden in den USA für das Jahr 2008 auf 147 Milliarden Dollar geschätzt. Dies entsprach ca. 9,1% der Jahresausgaben im medizinischen Sektor (Finkelstein et al. 2009). Unberücksichtigt blieben hierbei die Kosten durch Produktionsausfälle. Adipositas und die daraus resultierenden Folgen für die Gesellschaft und den Einzelnen machen eine weitere, tiefergehende Erforschung der Ursachen notwendig.

1.2 Definition und Klassifikation

Adipositas lässt sich als eine abnormale Anhäufung von Körperfett bezogen auf Alter und Geschlecht definieren. Die gängige Berechnungsgrundlage ist der BMI (Body Mass Index), in den das Körpergewicht je Kilogramm (kg) und die Körperhöhe in Metern (m) zum Quadrat mit eingehen (WHO 2016):

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m}^2\text{)}}$$

Bei Berechnungen des BMI nach dieser Formel findet man eine hohe Korrelation mit dem Körpergewicht, aber nur eine geringe Korrelation mit der Körperhöhe (Watson et al. 1979), weswegen diese Formel ein gutes Maß zur ersten Betrachtung und Beurteilung der Gesamtkörper-Fett-Masse darstellt. Die World Health Organisation (WHO) zieht den BMI zur Definition verschiedener Gewichtsklassen heran (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Klassifikation der Adipositas anhand des Body-Mass-Indexes mit Angabe des Risikos für Begleiterkrankungen (modifiziert nach WHO 2000).

| Kategorie | BMI (kg/m ²) | Risiko für Begleiterkrankungen |
|-------------------|--------------------------|--|
| Untergewicht | <18.50 | gering |
| Normalgewicht | 18.50-24.99 | gleich dem Bevölkerungsdurchschnitt |
| Übergewicht | >25 | |
| Präadipositas | 25-29.99 | leicht über dem Bevölkerungsdurchschnitt |
| Adipositas Grad 1 | 30-34.99 | leicht erhöht |
| Adipositas Grad 2 | 35-39.99 | erhöht |
| Adipositas Grad 3 | ≥40 | stark erhöht |

Präadipositas ist demzufolge definiert als ein BMI über 25 kg/m², eine Adipositas ist definiert als ein BMI über 30 kg/m² (WHO 2016). Man unterscheidet drei verschiedene Grade der Adipositas, die alle jeweils mit einem erhöhten Risiko für Begleiterkrankungen wie Bluthochdruck, metabolischem Syndrom oder Diabetes Typ 2 einhergehen (Janssen 2002). Einschränkungen in der Aussagekraft dieses Wertes liegen darin, dass er keine ausreichende Differenzierung zwischen einem erhöhten Muskelanteil, wie er bei Leistungssportlern zu erwarten ist, und einem erhöhten Fettanteil zeigt.

In der natürlichen Entwicklungsphase von Kindern und Jugendlichen finden sich alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede, die ebenfalls nur unzureichend vom BMI abgedeckt werden. Hier dient der BMI als erste Orientierung. Bessere Klassifikationsmöglichkeiten liefern geschlechtsspezifische BMI-Altersperzentile (siehe Abbildung 1.1).

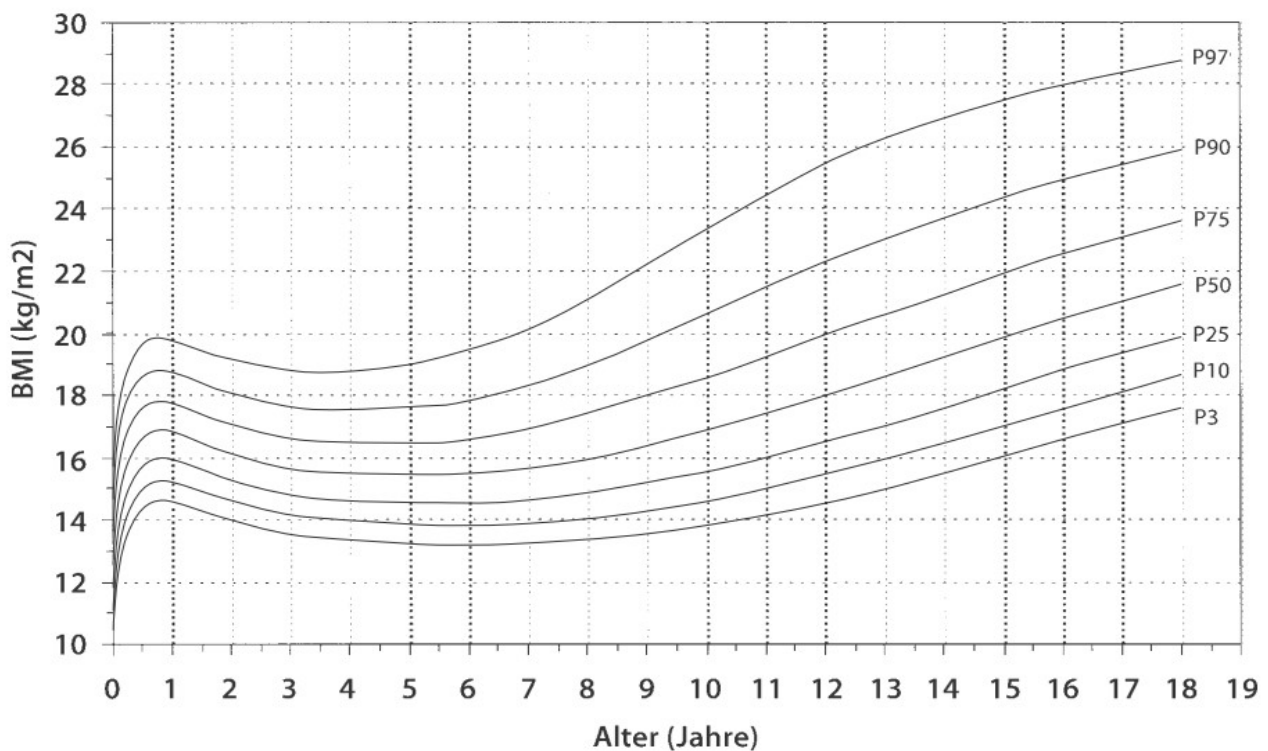


Abbildung 1.1 BMI-Perzentilen für männliche Kinder und Jugendliche bis zum einem Alter von 18 Jahren. Eingezeichnet sind die verschiedene Stufen von Unter- bis Übergewicht (Abbildung unverändert übernommen aus Kromeyer-Hauschild et al. 2001, ©Springer-Verlag 2001, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt).

Deutlich erkennbar ist, dass Übergewicht in der Altersgruppe der zwei- bis sechsjährigen bereits bei einem BMI von 18 beginnt. Würde man die WHO-Kriterien zum Übergewicht bei Erwachsenen auf diese Altersgruppe anwenden, käme man zu falsch negativen Ergebnissen.

In Deutschland definiert man Übergewicht im Kindes- und Jugendalter als BMI > 90. und Adipositas als BMI > 97. Perzentil der Altersgruppe (Goldapp und Mann 2004; Kromeyer-Hauschild et al. 2001) Internationale Grenzwerte für Übergewicht im Kindes- und Jugendalter sind nicht festgelegt; vergleichbare Studien mit übereinstimmenden Ergebnissen wurden aber auch in anderen Ländern wie Brasilien, Großbritannien und in den Niederlanden durchgeführt (Cole et al. 2000).

Ergänzend zur BMI-Bestimmung wird für alle Erwachsenen ab dem 18. Lebensjahr die Bestimmung des Fettverteilungsmusters von der deutschen Adipositasgesellschaft als weitere Methode empfohlen (Hauner 2007). Ziel ist es, genauere Aussagen über das Komorbiditäts-Risiko zu treffen. Man unterscheidet beim Fettverteilungsmuster die gluteofemorale Adipositas von der abdominal-viszeralen Adipositas.

Die abdominale Form der Adipositas ist gekennzeichnet durch die Bildung von Fettdepots im Bauchraum und geht mit einem stark erhöhten Risiko für adipositasassoziierte Stoffwechselerkrankungen einher. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der gluteofemoralen Adipositas kein erhöhtes Risiko für Komorbidität durch Stoffwechselerkrankungen (Guagnano et al. 2007). Zur Erfassung des Fettverteilungsmusters bietet sich die in Tabelle 1.2 dargestellte Messung des Taillenumfangs an (Lean et al. 1995).

Tabelle 1.2 Taillenumfang und Risiko für Komorbidität (nach Lean et al. 1995)

| Taillenumfang | | Risiko für Komorbidität |
|---------------|----------|-------------------------|
| Männer ♂ | Frauen ♀ | |
| ≥ 94 cm | ≥ 80 cm | erhöht |
| ≥ 102 cm | ≥ 88 cm | stark erhöht |

Der Taillenumfang sollte bei Männern unter 102 cm, bei Frauen unter 88 cm liegen. Hohe Werte deuten auf eine abdominale Form der Adipositas mit entsprechendem Risiko für Komorbidität wie Bluthochdruck, metabolischem Syndrom und Diabetes Typ 2 hin. Es zeigte sich eine enge Korrelation des Taillenumfanges mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Despres et al. 2001).

Eine alternative Methode zur Erfassung des Fettverteilungsmusters ist die Bestimmung des „waist-to-hip-ratio“ (WHR). Dieses Taille-Hüfte-Verhältnis liefert wie der Taillenumfang eine Aussage über die Komorbidität bei Adipositas. Bei Frauen sollte der WHR unter 0,85, bei Männern unter 1,0 liegen (Qiao und Nyamdorj 2010; WHO 2000, 2011). Ein größerer Wert deutet auf eine abdominal-viszerale Adipositas mit entsprechenden Folgeerkrankungen hin.

1.3 Epidemiologie: Prävalenz, Morbidität und Mortalität

1.3.1 Prävalenz

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen ist in den letzten 30 Jahren deutlich angestiegen. Die Anzahl der 6- bis 9-jährigen Kinder mit Übergewicht (>90. Perzentile) erhöhte sich seit 1975 um 178% bei Jungen und um 146% bei Mädchen (Nagel et al. 2009). Hielt der Trend einer steigenden Prävalenz in dieser Altersklasse bis zum Jahr 2005 an, so konnte in der letzten Dekade kein weiterer Anstieg mehr beobachtet werden. So liegt z.B. in Nordrhein-Westfalen die Prävalenz von Übergewicht bei 6-jährigen Kindern seit dem Jahr 2005 konstant bei etwa 10,7% und von Adipositas konstant bei etwa 4,4% (Moss et al. 2012). Regionale Unterschiede in der Prävalenz von Übergewicht lassen sich zwischen den verschiedenen Bundesländern finden. Während in Sachsen 8,4% der Kinder übergewichtig sind, liegt die Zahl übergewichtiger Kinder mit 11,9% in Bremen und Thüringen deutlich höher. Betrachtet man ausschließlich die Häufigkeit von Adipositas, so sind 3,3% der Kinder in Brandenburg und Sachsen adipös, wohingegen bis zu 5,4% der Kinder im Saarland als adipös gelten (Moss et al. 2012).

Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas jedoch deutlich an. Sind in der Altersgruppe der 14- bis 17-jährigen noch 18,1% der Jungen und 16,4% der

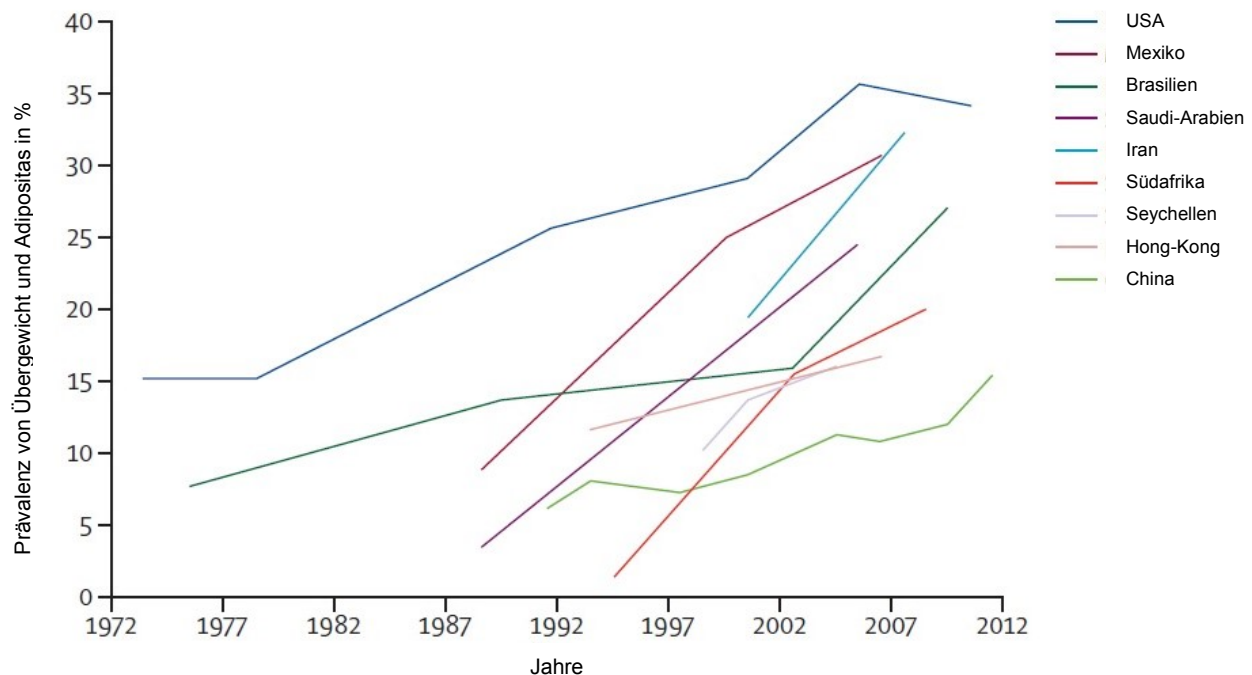


Abbildung 1.2 Prävalenz (in %) für Übergewicht und Adipositas in der Kindheit in den USA und 8 weiteren Ländern über einen Zeitraum seit 1972 (Abbildung übernommen und mit deutschen Achsenbeschriftungen versehen aus Lobstein et al. 2015., ©The Lancet 2015, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt)

Mädchen übergewichtig oder adipös, steigt bei den 70- bis 80-jährigen dieser Anteil auf 84,2% bei den Männern und 74,1% bei den Frauen (Max Rubner-Institut und das Bundesministerium für Ernährung 2008). Zusammenfassend betrachtet ist Deutschland in den letzten beiden Dekaden zunehmend dicker geworden. Waren im Jahr 1999 56% der Männer und 40% der Frauen übergewichtig oder adipös, so stiegen diese Werte im Jahr 2013 auf 62,0% der Männer und 43% der Frauen (Statistisches Bundesamt 2014a, 2014b).

Ein ähnlicher Trend lässt sich auch in anderen Ländern der Welt feststellen. Die Prävalenz von Übergewicht, insbesondere unter Kindern und Jugendlichen, nahm über die letzten Dekaden stetig zu und stagniert, wenn überhaupt, auf unverändert hohem Niveau (Lobstein et al. 2015). Eine Übersicht über die Prävalenz in den USA und 8 weiteren Ländern liefert Abbildung 1.2.

1.3.2 Morbidität

Kinder und Jugendliche, die übergewichtig sind, haben im Vergleich zu solchen mit Normalgewicht ein erhöhtes Risiko, später in ihrem Leben an Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2, Dyslipidämie, Bluthochdruck und Arteriosklerose zu erkranken (Juonala et al. 2011). Problematisch ist, dass übergewichtige Kinder und Jugendliche ein hohes Risiko aufweisen, im Erwachsenenalter ebenfalls übergewichtig zu sein (Singh et al. 2008).

1.3.3 Mortalität

Von der früheren Annahme, dass Übergewicht und Adipositas *immer* zu erhöhten Sterblichkeitsraten im Vergleich zur Normalbevölkerung führen, ist man heute zum Teil abgerückt. Zwar versterben adipöse Menschen generell im Vergleich zur normalgewichtigen Bevölkerung früher (Adipositas Grad 1 = Verlust von ca. 2,17 Lebensjahren, bei Grad 2 = Verlust von ca. 3,17 Lebensjahren, bei Grad 3 = Verlust von ca. 4,32 Lebensjahren; Chang et al. 2013), neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass übergewichtige Menschen und Menschen mit einer Adipositas Grad 1 Überlebensvorteile bei bestimmten Krankheiten aufweisen. Bei Diabetes Mellitus Typ 2 und Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems überleben diese Gruppen gegenüber Normalgewichtigen und Menschen mit Adipositas Grad 2 und 3 signifikant länger. Dieses Phänomen wird auch „Adipositas-Paradoxon“ bezeichnet (Flegal et al. 2013).

1.4 Umweltbedingte Aspekte der Adipositas

Adipositas kann als multifaktorielle Störung verstanden werden. Im Folgenden werden umweltbedingte Aspekte zur Gewichtsregulation beleuchtet und auf die Regulation der Nahrungsaufnahme eingegangen.

1.4.1 Umweltbedingte Aspekte

Unsere heutige Welt hat sich gegenüber der Welt vor noch 200 Jahren dramatisch verändert. War es in der Evolution ursprünglich von Vorteil, jegliche zugeführte Energie erfolgreich zu verwerten und zu speichern, kippt dieser Vorteil in Teilen der Welt mit ausreichendem Nahrungsangebot ins Negative (Lee 2009).

Durch zunehmende Automatisierung und die ständige Verfügbarkeit von hochkalorischem Essen entsteht eine Umwelt, die durch eine ungehemmte Aufnahme von Nahrung bei gleichzeitig weniger Verbrauch von Kalorien durch inaktiven Lebensstil geprägt ist. Die gleichzeitige Veränderung der Essgewohnheiten – weg von Früchten und Obst hin zu mehr Kohlenhydraten – führt ebenfalls zu einer Zunahme der täglich konsumierten Kalorien (Caballero 2007).

Ein weiterer Faktor, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, sind Einflüsse der Werbung auf das Ernährungsverhalten. Reklame im TV besonders zu der Uhrzeit, zu der diese Gruppe hauptsächlich Fernsehen schaut, besteht überwiegend aus Werbung für ungesunde gesüßte Softdrinks (37% der Werbezeit), salzige Snacks (24%), Süßigkeiten (21%) und Fast Food wie Instant-Produkte etc. (18%). Gleichzeitig stiegen die Werbeausgaben der beiden großen Softdrink-Produzenten in den letzten 6 Jahren z.B. im Mittleren Osten um das 10fache (Lobstein et al. 2015).

Eine weitere nicht zu vernachlässigende Faktor liegt darin, dass die zunehmende Stigmatisierung von adipösen Individuen und die dadurch eingeschränkte Partnerwahl zu einer erheblich erblichen Belastung für Kinder solcher adipösen Paare führen kann (assortative mating). Besonders die Ausprägung massiver Adipositas könnte dadurch über die Generationen ansteigen (Hebebrand et al. 2000).

1.4.1.1 Medizinische Aspekte

Verschiedene Krankheiten können mit extremer Adipositas einhergehen. Somatische Erkrankungen wie Morbus Cushing, Hypothyreoidismus und ein Mangel an Wachstumshormonen führen häufig zu erhöhtem Gewicht (Rosen et al. 1993). Psychische Störungen wie das Binge-Eating-Syndrom oder das Night-Eating-Syndrom sind ebenfalls ein Prädiktor für Übergewicht. Medikamente wie Antidepressiva, Antipsychotika, Insulin, aber auch orale Kontrazeptiva können ebenfalls zu erhöhtem Gewicht führen (Haslam und James 2005).

1.5 Regulation des Körpergewichts

Die Regulation des Körpergewichts im Zusammenspiel mit Energieaufnahme und –verbrauch ist ein komplexer Vorgang, der noch nicht abschließend erklärt werden kann. Zentrale und periphere Regulationsmechanismen sind daran beteiligt, das Gewicht ständig auf einen „genetischen Setpoint“ einzustellen, der über das Leben konstant bleibt (Schwartz et al. 2000). Der Misserfolg vieler Diäten könnte mit diesem „Setpoint“ erklärt werden (Blomain et al. 2013).

Lediglich ca. 500g nimmt ein Individuum durchschnittlich pro Jahr zu (Hebebrand und Remschmidt 1995). Dies zeigt, wie effektiv die Regulationsmechanismen das Körpergewicht über einen langen Zeitraum nahezu konstant halten, trotz einer täglichen Energiezufuhr von ca. 8000 kJ/d.

1.5.1 Zentralnervöse Regelkreise

Die überwiegende Anzahl der signifikant mit Adipositas korrelierten Loci im Genom sind im menschlichen Gehirn exprimiert (Lein et al. 2007; Locke et al. 2015; Speliotes et al. 2010). Dies zeigt die Bedeutung von zentralnervösen Strukturen für die Regulation des Körpergewichts. Nahezu alle Hirnareale sind beim Menschen an der Energiehomöostase beteiligt. Neben Großhirn, limbischem System, subkortikalen Arealen und dem Hirnstamm ist besonders der Hypothalamus mit seinen Kerngebieten hervorzuheben. Nach gängiger Lehrmeinung spielen die Hypothalamuskern Nucleus paraventricularis (PVN), Nucleus arcuatus (ARC), Nucleus ventromedialis (VMH) und Nucleus dorsomedialis zusammen mit dem lateralen Hypothalamus (LHA) entscheidende Rollen als regulatorische Zentren (Schwartz et al. 2000). Besonders der Ncl. arcuatus soll entscheidend an der Detektion der zirkulierenden peripheren Hormone (wie Leptin und Insulin) beteiligt sein und als „erste Station“ im Regelkreislauf auf die anderen, höher geordneten Kerne projizieren (Schwartz et al. 2000). Durch Freisetzung verschiedener Peptide können diese Kerne die Nahrungsaufnahme beeinflussen, je nachdem, ob zu wenig oder zu viel Energie im Körperkreislauf vorhanden ist. Man teilt die beteiligten Peptide in anorexigen, oder Nahrungsaufnahme hemmend, und orexigen, oder Nahrungsaufnahme stimulierend, ein (Schwartz et al. 2000).

1.5.1.1 Anorexigene Neurotransmitter

Anorexigene Neurotransmitter führen zu einer katabolen Stoffwechsellage, die durch geringere Nahrungsaufnahme und Appetitlosigkeit gekennzeichnet ist. Die hauptsächlich involvierten Peptide werden unter dem Namen Melanocortine zusammengefasst und umfassen alle Peptide, die aus Proopiomelanocortin (POMC) entstehen (wie ACTH [Adrenocorticotropes Hormon] und MSH [Melanozyten-stimulierendes Hormon] mit den Unterformen α , β und γ), dazu noch CART (Cocain- und Amphetamin-regulierendes Transkript), CRH (Corticotropin-freisetzendes Hormon), TRH (Thyreotropin-freisetzendes Hormon) und IL-1 β (Interleukin-1 β). POMC und CART werden ko-exprimiert im ARC und bei anaboler Stoffwechsellage an die höher geordneten Zentren im Hypothalamus, PVN und LHA/PFA (perifornikale Region), abgegeben. Aus POMC werden über das Enzym Proprotein-Convertase 1 (PC-1) (siehe auch „Monogene Formen der Adipositas und die Rolle des Leptin-Melanocortin-Regelkreises“, S.16) die Peptide ACTH und MSH (α , β , γ) hergestellt. Besonders α - und β -MSH sind starke Agonisten am MC4-Rezeptor und führen zu einem starken Sättigungsgefühl (Hebebrand et al. 2013).

Mutationen insbesondere am MC4-Rezeptor können zu Übergewicht führen. Alle Melanocortine aktivieren den Sympathikus und führen zu einer negativen Energiebilanz mit Sättigungsgefühl, kataboler Stoffwechsellaage und Gewichtsabnahme (Fehm et al. 2004; Schwartz et al. 2000).

1.5.1.2 Orexigene Neurotransmitter

Orexigene Neurotransmitter führen zu einer anabolen Stoffwechsellaage, die durch erhöhte Nahrungsaufnahme und Hunger gekennzeichnet ist. Typische Vertreter sind Neuropeptid Y (NPY), welches eher schnellwirksam ist, Agouti-related protein (AGRP), welches eher länger wirkt, MCH (Melanin-konzentrierendes Hormon) und Orexin 1 und 2. NPY und AGRP sind ko-lokalisiert im ARC und werden bei kataboler Stoffwechsellaage (vermittelt durch z.B. niedrigere Spiegel an peripheren Hormonen wie Insulin und Leptin) an die höher geordneten Zentren im Hypothalamus, PVN und LHA/PFA, abgegeben. Dort stimulieren sie die Freisetzung von Hypokretin aus der PFA und von MCH aus dem LHA. Diese beiden Peptide wiederum führen zu einem Hungergefühl, aktivieren den Parasympathikus und führen so zu einer positiven Energiebilanz mit Gewichtszunahme (Schwartz et al. 2000).

1.5.2 Periphere Regelkreise

Als wichtige Teilnehmer in der peripheren Steuerung der Energiehomöostase sind der Nervus Vagus (X. Hirnnerv), die Motilität und mechanische Aktivität des Gastrointestinaltraktes und des Nucleus tractus solitarii (= *Geschmackskern*, NTS) anzusehen. Ebenso spielen die Adipozyten, das Pankreas und die Bluthirnschranke am Hypothalamus eine wichtige Rolle (Bloom et al. 2013; Schwartz et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Störungen der Bluthirnschranke, ggf. kombiniert mit einer peripheren Leptin-Resistenz, zu einem nahezu unmöglichen Transport von Leptin über die Bluthirnschranke führt. Dadurch ist die Leptinwirkung auf den Hypothalamus drastisch herabgesetzt. Es fehlen so die Information, wie viele Fettdepots gefüllt sind (Banks 2012; Schwartz et al. 2000).

1.5.2.1 Kurzfristige Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung

Während der Nahrungsaufnahme sorgen verschiedene Systeme für eine Rückmeldung über die Größe der Mahlzeit und den Sättigungsgrad. Der Energiemetabolismus der Leber scheint über den N.Vagus Informationen über den Energiehaushalt zu vermitteln (Schwartz et al. 2000). Die Dehnung und die Geschwindigkeit der Nahrungspassage durch Magen und Duodenum werden, zusammen mit Afferenzen über die Nahrungszusammensetzung, über den N.Vagus an den NTS geleitet. Über komplexe Bahnen ist der Hypothalamus mit dem NTS verbunden, so dass Insulin und insbesondere Leptin den sättigenden Effekt von peripheren Mediatoren (wie z.B. Cholecystokinin) triggern können (Schwartz et al. 2000).

Es sind ca. 20 Hormone aus dem Gastrointestinaltrakt bekannt, die alle Einfluss auf die kurzfristige Steuerung der Nahrungsaufnahme haben. Freigesetzt werden sie durch verschiedene Stimuli wie freie Fettsäuren, Proteine, Aminosäuren und Zucker (Schwartz et al. 2000). So wirken das Peptid-Tyrosin-Tyrosin (PYY), das Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1), das Oxyntomodulin (OXM), das Cholecystokin (CCK) und das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) hemmend auf die weitere Nahrungsaufnahme und vermitteln ein Sättigungsgefühl. Für alle Hormone sind ebenfalls zentrale Wirkungen am ARC beschrieben. CCK vermittelt einen Hauptteil seiner Wirkung über den N.Vagus am NTS (Banks 2012).

1.5.2.2 Langfristige Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung

Obwohl der Hypothalamus die Energiehomöostase auf neuronaler Ebene reguliert, ist das zentrale System auf Informationen über die verfügbare Energiemenge im restlichen Organismus, der Peripherie, angewiesen. Bereits im Jahr 1976 konnte gezeigt werden, dass zirkulierendes Insulin vielfältige Einflüsse auf das Hunger- und Sättigungsgefühl hat (Rezek 1976). Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas hergestellt und durch Stimuli wie hohe Glucosekonzentration im Blut, Verfügbarkeit von freien Aminosäuren in der Nahrung und unter Einfluss verschiedener Hormone (GIP, GLP-1, Gastrin) freigesetzt (Jacobsen et al. 2012).

Leptin wird aus den Adipozyten des peripheren Fettgewebes proportional zur Fettmasse freigegeben und zirkuliert frei im Blut. Mit der Entdeckung des Leptins hoffte man auf eine einfache Erklärung der Entstehung von Adipositas (Zhang et al. 1994). Mittlerweile nimmt man jedoch an, dass Leptin die Aufgabe eines „Adipometers“ besitzt und dass das zirkulierende Leptin dem Gehirn Auskunft darüber gibt, wie gefüllt die Fettdepots sind (Banks 2012). Im Blut adipöser Individuen findet sich regelhaft eine Hyperleptinämie, die am ehesten durch eine partielle Leptinresistenz, bedingt durch einen erhöhten Körperfettanteil, erklärbar ist (Hinney et al. 2015).

Rezeptoren für Insulin und Leptin finden sich im Hypothalamus am ARC, wo die weitere, zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme stattfindet.

1.5.3 Mitochondrien

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zellen. Eine ihrer Hauptaufgaben ist die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP) mittels oxidativer Phosphorylierung, weshalb man eine Relevanz von Mitochondrien-Dysfunktionen für die Entstehung von Adipositas diskutiert (Knoll et al. 2013). Adipöse Erwachsene zeigten im Vergleich zu Normalgewichtigen in einigen Fällen kleinere Mitochondrien in Skelettmuskelzellen und eine verringerte Komplex-I-Aktivität in Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten (Kelley et al. 2002; Niemann et al. 2011). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Adipositas mit einer verringerten Expression von verschiedenen mitochondrialen Transkriptionsfaktoren einhergeht. Daraus resultiert

eine deutlich geringere Konzentration von Nicotinamidadenindinukleotid-Dehydrogenase-6, die ein essentieller Bestandteil des Komplexes-I in der Atmungskette von Mitochondrien ist (Niemann et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Regulation des Körpergewichts einem multifaktoriellen Geschehen unterliegt. Da man jedoch davon ausgeht, dass der größte Anteil, der für die Ausprägung einer Adipositas verantwortlich ist, genetisch bedingt ist (ca. 50 bis 80%), widmet sich der folgende Teil der Arbeit den genetischen Aspekten der Adipositas (Nan et al. 2012; Vimalaswaran et al. 2012).

1.6 Genetische Aspekte

Eine Idee zur Beteiligung genetischer Faktoren an der Ausprägung des Körpergewichts wurde von Neel im Jahr 1962 für die Erkrankung Diabetes Mellitus postuliert („thrifty genotype hypothesis“). Er nahm an, dass Gene, die besonders „sparsam“ mit Energie umgehen, bevorzugt vererbt werden, da der sparsame Umgang mit Energie in Hungerzeiten zu einem Überlebensvorteil führt (Neel 1962).

Im Folgenden werden zunächst Ergebnisse aus Familienstudien beleuchtet und anschließend auf molekulargenetische Aspekte der Adipositas eingegangen.

1.6.1 Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien

Durch zahlreiche Zwillings-, Familien- und Adoptionsstudien schätzt man die Heritabilität des Körpergewichts auf Werte zwischen 50% und 80%. Die größte Korrelation beim Körpergewicht findet sich bei eineiigen Zwillingen, wobei eineiige Zwillinge eine höhere Korrelation aufweisen als zweieiige. Selbst bei einer Trennung von eineiigen Zwillingen direkt nach der Geburt bleibt diese hohe Korrelation in den ersten Dekaden des Lebens bestehen (Hebebrand et al. 2013; Hinney et al. 2015). Im Laufe des Lebens bestimmen vermehrt individuelle Faktoren (Lebensweise, Umwelt) die Ausprägung des Körpergewichts, jedoch sind auch epigenetische Faktoren nicht auszuschließen. Adoptionsstudien konnten zeigen, dass der BMI adoptierter Kinder stärker dem BMI der leiblichen Eltern als dem BMI der Adoptiveltern ähnelt (Hinney et al. 2015). Die genetische Komponente für die Entwicklung von Übergewicht liegt damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Körperhöhe eines Individuums (Nan et al. 2012).

1.6.2 Syndromale Formen der Adipositas beim Menschen

Tritt Adipositas zusammen mit anderen Krankheitssymptomen auf, spricht man von einer syndromalen Form der Adipositas. Zurzeit sind ca. 50 genetische Erkrankungen bekannt, die mit extremer Adipositas einhergehen (Hinney et al. 2015). Das häufigste Beispiel einer syndromalen Form ist das Prader-Willi-Syndrom (PWS) mit einer Inzidenz von 1/30000. Diese Erkrankung betrifft mehrere Organsysteme und geht ab der Neugeborenenphase mit Symptomen

wie Hypophagie, starker muskulärer Hypotonie, charakteristischen Dysmorphien und Wachstumsdefizit einher. Die Meilensteine der Kindesentwicklung werden verspätet absolviert, der Intelligenzquotient (IQ) bleibt lebenslang herabgesetzt (häufig zwischen 60-70). Ab dem 2.-4. Lebensjahr beginnt eine hypothalamisch gesteuerte Hyperphagie, die ohne Kontrolle von außen immer zu einer Fettleibigkeit führt (zentrale Adipositas). Es besteht zudem ein Längenwachstumsdefizit und ein Hypogonadismus. Molekulargenetisch findet sich bei dieser Erkrankung ein Funktionsverlust der väterlichen Gene im Abschnitt q11.2-q13 auf Chromosom 15, die dem Imprinting unterliegen. Es werden 3 verschiedene Ursachen unterschieden: eine paternale Mikrodeletion, die in ca. 70% der Fälle ursächlich ist, eine maternale uniparenterale Disomie, die in ca. 25-30% der Fälle ursächlich ist, und ein Imprinting-Defekt, der in ca. 2-5% der Fälle ursächlich ist (Jin 2011).

1.6.3 Molekulargenetische Verfahren in der Adipositas-Forschung

1.6.3.1 Kandidatengenansatz

Gene, die als mögliche Kandidaten für die Entstehung von Adipositas gelten, können durch mehrere Möglichkeiten identifiziert werden. Zum einen ist es möglich, ein Gen, das an einem Stoffwechselweg beteiligt ist, zu untersuchen. Eine andere Möglichkeit ist es, auffällige genetische Befunde aus Tiermodellen auf den Menschen zu übertragen und so mögliche Kandidatengene zu identifizieren (Vimalaswaran et al. 2012).

Vermutet man in einem Kandidatengen einen Einfluss auf die Entstehung von Übergewicht, wird im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie dieses Gen bei adipösen Individuen (Fälle) molekulargenetisch auf Varianten untersucht und anschließend mit normalgewichtigen Kontrollen verglichen. Finden sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, liegt eine Assoziation dieser Genvarianten mit der Ausbildung einer Adipositas nahe. Ein Problem dieses Ansatzes ist die Notwendigkeit recht großer Studiengruppen, um valide Ergebnisse bei kleinen polygenen Effekten zu erhalten (Hinney et al. 2015).

1.6.3.2 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Eine weitere Möglichkeit ist die Durchführung von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), um Regionen im menschlichen Genom zu finden, welche mit Adipositas assoziiert sind (Hinney et al. 2010). Anders als beim Kandidatengenansatz gibt es vor Durchführung der Studie keine Annahme bzgl. der Auswirkung auf die Entstehung einer Adipositas einer bestimmten genomischen Region oder eines bestimmten Gens (Hinney et al. 2015).

In GWAS untersucht man das Genom anhand von vorher definierten Markern wie Einzelnukleotidaustausche (*engl.* single nucleotide polymorphisms, SNPs) oder Kopienzahlvarianten (*engl.* copy number variations, CNVs) in einer großen Anzahl von Individuen, die in der zu untersuchenden Gruppe ein Merkmal (z.B. Adipositas) aufweisen (Fälle) und vergleicht gegen

eine Kontrollgruppe, die dieses Merkmal nicht aufweist (Kontrollen). Diese DNA-Marker decken das gesamte menschliche Genom ab. Bei Varianten in der DNA-Sequenz mit einer Frequenz von über 1% in der Normalbevölkerung spricht man von SNPs. CNVs sind Deletionen oder Insertionen ganzer Genabschnitte von definitionsgemäß mindestens 1 kB bis zu mehreren Megabasen Länge (Hebebrand et al. 2013).

Zeigt sich nach Durchführung dieser Chip-basierten Methode ein signifikanter Frequenzunterschied ($p\text{-Wert} < 5 \times 10^{-8}$) an einer bestimmten Stelle zwischen den Fällen und den Kontrollen, ist diese Stelle im Genom mit dem untersuchten Merkmal assoziiert (Hinney et al. 2015). Nach Identifikation korrelierter Loci wird auf den Kandidatengenansatz zurückgegriffen, um den detektierten Bereich genauer zu untersuchen. So werden im Anschluss an eine GWAS die Gene im korrelierten Loci genauer in ihrer Funktion untersucht, evtl. gibt es auch bereits wegweisende Befunde aus Tiermodellen. Die Loci lassen sich z.B. durch molekulargenetische Verfahren genauer untersuchen, wobei es wichtig ist, neben den Exon- auch die Intron-Sequenzen und die regulatorischen Bereiche zu untersuchen, da besonders in diesen Bereich über die Expression der Exonbereiche entschieden wird.

Nach Detektion des Phänotyp-verursachenden Kandidatengens lassen sich funktionelle Studien, z.B. auf Zellebene oder im Mausmodell, durchführen, um die Pathogenese genauer zu verstehen (Vimaleswaran et al. 2012).

1.6.4 Monogene Formen der Adipositas und die Rolle des Leptin-Melanocortin-Regelkreises

Im Jahr 1995 wurde das kodierende Gen für das Hormon Leptin molekulargenetisch beschrieben (Zhang et al. 1994). Leptin sorgt für ein Sättigungsgefühl, nachdem es an den Leptin-Rezeptor gebunden hat, und führt so zu einer Appetitminderung (Hinney et al. 2015). 1997 wurde, nach vorausgehenden Experimenten im Mausmodell, eine Mutation im menschlichen Leptin-Gen gefunden, die dafür sorgte, dass das gebildete Leptin nicht an seinen Ziel-Rezeptor binden kann. Ursächlich hierfür ist eine homozygote Basenpaardeletion im Leptin-Gen, die zu einer Leseraster-Verschiebung führt. Diese Mutation führte bei zwei Individuen bereits ab Beginn der frühen Kindheit zu extremer Adipositas mit unstillbarem Hunger und einem nicht vorhandenen Sättigungsgefühl (Montague et al. 1997). Eine Therapie mit rekombinantem Leptin, welches subkutan appliziert wurde, führte zu einer deutlichen Gewichtsabnahme mit Normalisierung des Essverhaltens (Farooqi et al. 1999; Hebebrand et al. 2013).

Kurz darauf wurde eine Mutation im humanen Leptin-Rezeptor beschrieben, die bei homozygoten Individuen zu extremer Adipositas, ausbleibender Pubertät, verminderter Wachstumshormonkonzentration und erniedrigten Thyreotropin-Spiegeln führt. Leptin scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der hypophysären und hypothalamischen Funktionsfähigkeit zu spielen (Clement et al. 1998; Hinney et al. 2015).

Weitere seltene Mutationen im *POMC*-Gen können ebenfalls ursächlich für Adipositas sein. POMC wird in die Hormone ACTH und MSH mit den Unterformen α , β und γ verstoffwechselt. Mutationen dieses Gens führen zu einem charakteristischen Phänotyp mit Pigmentstörungen (weiße Haut, rotes Haar), Adipositas und Nebennierenrinden-Insuffizienz (Krude et al. 1998). Die proteolytische Spaltung von POMC wird vom Enzym Proprotein-Convertase 1 (PC-1) katalysiert, für das ebenfalls Mutationen beschrieben sind, die zu extremem Übergewicht mit gestörtem Glucose-Stoffwechsel und persistierenden Diarrhoen führen können (Farooqi et al. 2007).

Nachgeschaltet zum Leptin findet sich der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R). Mutationen im hypothalamischen MC4-Rezeptorgen haben großen Einfluss auf die Entstehung von Adipositas. Es sind bislang über 160 Mutationen bekannt, die zu einer Insuffizienz oder einem starken Funktionsverlust führen und somit in einem verminderten Sättigungsgefühl resultieren (Hinney et al. 2015). Man geht davon aus, dass funktionseinschränkende Mutationen in diesem Gen für 1-6% der extremen Adipositas im Kindes- und Jugendalter verantwortlich sind (Hinney et al. 2006). Bei extrem adipösen Erwachsenen finden sich in ca. 1% gewichtsfördernde Mutationen (Hinney et al. 2015). Der quantitative Effekt dieser Mutationen wird mit einer Steigerung des BMIs um +4 kg/m² bei Männern und um +9,5 kg/m² bei Frauen im Vergleich zum Wildtyp berichtet (Dempfle et al. 2004). Neben Adipositas finden sich auch Symptome wie Hyperinsulinämie, erhöhte Wachstumsrate und eine größere Knochendichte (Hinney et al. 2010).

Überraschenderweise finden sich jedoch im *MC4R*-Gen auch Mutationen, die einen protektiven Effekt auf die Ausbildung einer Adipositas haben und zu einer Gewichtsreduktion prädisponieren. Hierunter fallen die zwei Polymorphismen Val103Ile und Ile251Leu. Träger eines dieser seltenen Allele (103Ile, 251Leu) haben ein um ca. 30 % reduziertes Risiko, eine Adipositas auszubilden. *MC4R* kann somit als Hauptgen für Adipositas, aber auch als Polygen für die Gewichtsregulation betrachtet werden (Hinney et al. 2015).

1.6.5 Polygene Formen der Adipositas

Im Gegensatz zur monogenen Form der Adipositas, bei dem ein Gen zu einem deutlich messbaren Effekt führt, sind bei polygenen Formen mehrere Gene beteiligt, die alle einen jeweils kleinen Teil zum Effekt beitragen. Diese bislang beschriebenen Genvarianten wirken additiv; mehrere Varianten summieren sich zum Phänotyp auf (Hinney et al. 2015). Wie bei polygenetischen Varianten zu erwarten, trägt jede Variante nur einen sehr kleinen Anteil zur Gewichtssteigerung bei. Man geht davon aus, dass jede Variante im Mittel nur einen Einfluss von 170g auf das Körpergewicht hat, mit Ausnahme des *FTO*-Gens (*engl.* „Fat mass and obesity-associated protein“), das für eine Gewichtssteigerung von bis zu 1,5 kg je Risikoallel verantwortlich ist (Hebebrand et al. 2013; Hinney et al. 2015).

Zwei Arbeiten aus den letzten Jahren trugen maßgeblich zum Verständnis der polygenen Adipositas bei (Locke et al. 2015; Speliotes et al. 2010). In der letzten GWAS, veröffentlicht im

Jahr 2015, wurden 339,224 Individuen untersucht (Locke et al. 2015). Es wurden insgesamt 97 genomische Loci, die mit Adipositas assoziiert sind ($p\text{-Wert} < 5 \times 10^{-8}$), gefunden, von denen 56 vorher noch nicht beschrieben wurden. Alle detektierten Loci erklären ca. 2,7% der BMI-Varianz (Locke et al. 2015).

1.6.6 GWAS und ihr Beitrag zur Identifikation möglicher Kandidatengene für die Entstehung von Adipositas

Speliotes et al. beschrieben im Jahr 2010 in einer GWA-Studie mit 249,796 Individuen (123.865 in der initialen Untersuchung, weitere 125.931 in den Bestätigungsanalysen) insgesamt 18 neue relevante Loci für Adipositas. Zusätzlich konnten ebenfalls die bereits vorher bekannten 14 Loci bestätigt werden, so dass zum Zeitpunkt der Studie insgesamt 32 Loci im menschlichen Genom eine Assoziation zu Adipositas aufwiesen ($p\text{-Wert} < 5 \times 10^{-8}$). Man geht allerdings davon aus, dass die neubeschriebenen Loci weniger zum BMI beitragen als die bereits vorher bekannten. Im Durchschnitt erhöht jedes der 32 Risikoallele den BMI um 0,17 kg/m² (Hebebrand et al. 2013). Viele der Loci sind wichtig für neuronale Kreisläufe, was erneut die Bedeutung des zentralen Nervensystems (ZNS) für die Energiehomöostase nahelegt. Neben den bereits bekannten Loci nahe *MC4R* oder *FTO* wurden ebenso Genorte gefunden, die man vorher mit dem Taillenumfang positiv korrelierte (wie *NRXN3*, Hebebrand et al. 2010; Speliotes et al. 2010).

Einer der mit Adipositas positiv korrelierten SNPs (rs7359397), die durch die Arbeitsgruppe um Speliotes et al. beschrieben wurden, liegt in der chromosomalen 16p11.2-Region (siehe auch Abbildung 1.3 auf S.19) in hohem Kopplungsungleichgewicht (*engl.* linkage disequilibrium, LD) zu Varianten in den Genen für das Src-homologe-2B-Adapter Protein-1 (*SH2B1*, rs7359397, $r^2 = 1$), den Apolipoprotein B48-Rezeptor (*APOB48R*, rs2411453, $r^2 = 0.82$), der Familie der Sulfotransferasen 1A (*SULT1A1*, rs7359397, $r^2 = 1$; *SULT1A2*, rs1074631, $r^2 = 0,8$; *SULT1A3*, rs151181, $r^2 = 0,75$;) und für den mitochondrialen Tu-translationalen Elongationsfaktor (*engl.* ‚Tu translation elongation factor mitochondrial gene‘, *TUFM*, rs12928404, $r^2 = 0,98$; Speliotes et al. 2010). Der Begriff Kopplungsungleichgewicht beschreibt die Assoziation zweier genomischer Loci; diese liegen in hohem Kopplungsungleichgewicht ($r^2 = 1$), wenn ihre Assoziation häufiger ist als man es bei einer freien Vererbung erwarten würde (Slatkin 2008). Im Jahr 2015 wurden die Ergebnisse einer noch größeren GWAS publiziert. Locke et al. (2015) untersuchten insgesamt 339,224 Individuen und fanden 97 Loci, die mit Adipositas assoziiert sind, wovon 56 noch nicht vorher beschrieben wurden. Die Ergebnisse aus der Arbeit von Speliotes et al. (2010) bestätigten sich; wiederum lag in der chromosomalen Region 16p11.2 ein mit Adipositas positiv korrelierter SNP (rs3888190) in der Nähe von *SH2B1* (rs12928404, $r^2 = 0,93$) und *TUFM* (rs8049439, $r^2 = 0,99$).

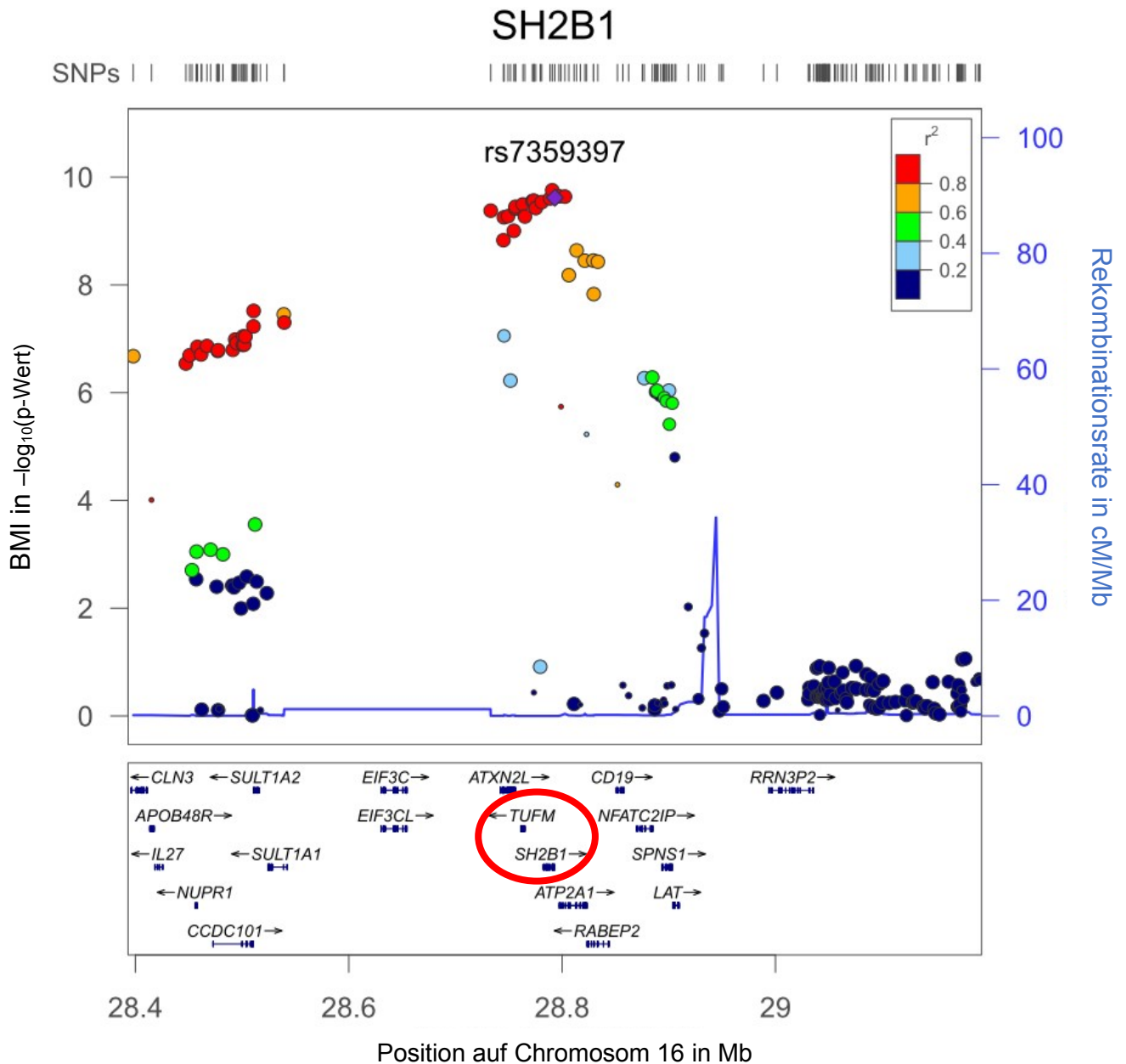


Abbildung 1.3 Dargestellt ist die chromosomale Region 16p11.2 und der SNP rs7359397, korreliert mit dem BMI ($-\log_{10} p$). Die Rekombinationsrate ist blau dargestellt. Mehrere genomische Loci liegen in hohem LD ($r^2 > 0.8$, rote Punkte) zu diesem SNP, darunter *SH2B1* und *TUFM* (roter Kreis, Abbildung selbst erstellt nach Speliotes et al. 2010 durch die Software „LocusZoom“ [<http://locuszoom.sph.umich.edu/locuszoom/>], Pruim et al. 2010, mittels der Daten „hapMap/hg18 Phase II CEU“ [<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>]).

1.7 Die chromosomale Region 16p11.2

1.7.1 *SH2B1* als Kandidatengen für Adipositas

SH2B1 ist ein Protein, das mit dem Insulin-Rezeptor interagiert (Kotani et al. 1998; Nelms et al. 1999). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass *SH2B1* stark im ZNS exprimiert wird und bei einer seltenen Deletion bereits im Kindesalter zu schwerer Adipositas führt (Bochukova et al. 2010; Willer et al. 2008). Molekulargenetische Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss von *SH2B1* auf die Ausbildung von Adipositas im Kindes- und Jugendalter zeigten, dass sich für den SNP rs7498665 (Thr484Ala), eine häufige kodierende Variante, eine nominale Assoziation ($p=0.019$) zu Adipositas nachweisen ließ. Die ebenfalls detektierte seltene Mutation β Thr656Ile/ γ Pro674Ser zeigte keine Assoziation mit Adipositas ($p = 1$). Einen Einfluss auf den Leptinsignalweg zeigten *in vitro* weder die *SH2B1*-Variante rs7498665 noch die seltene Mutation β Thr656Ile/ γ Pro674Ser (Volckmar et al. 2012).

1.7.2 *TUFM* als Kandidatengen für Adipositas

1.7.2.1 Eigenschaften von *TUFM*

TUFM (auch *EF-Tu* = mitochondrial translation elongation factor Tu, auch *P43*, veraltet auch *COXPD4*) wurde erstmals im Jahr 1997 komplett in seiner cDNA, seiner Struktur und seiner Lokalisation beschrieben (Ling et al. 1997). Es befindet sich auf Chromosom 16p11.2 (nach *Ensembl Build 84* - veröffentlicht im März 2016 [<http://www.ensembl.org/index.html>]: Chromosom 16: 28,842,411-28,846,408, zuletzt abgerufen am 09.07.2016) und hat eine Länge von 3997 bp (Basenpaaren). Es besteht aus 10 Exons, die ein Transkript von 1677 bp ergeben, welches sich aus einer kodierenden Region von 1368 bp zusammensetzt und eine 101 bp lange 5'-untranslatierte mit einer 207 bp langen 3'-untranslatierten Region aufweist. Das entstehende Protein wiegt ca. 49,8 kDa und besteht aus 455 Aminosäuren, wobei das N-terminale Ende ca. 50 Aminosäuren umfasst (Ling et al. 1997). Ein intronfreies korrespondierendes Pseudogen mit einer ungefähren Länge von 1700 bp findet sich auf Chromosom 17q11.2. Dieses Pseudogen ähnelt *TUFMs* cDNA zu 92,6% und entstand entwicklungsgeschichtlich am wahrscheinlichsten durch Retrotransposition (Ling et al. 1997). Durch eine veränderte Basensequenz im Pseudogen kann allerdings nicht dasselbe Protein wie durch *TUFM* entstehen. Das Pseudogen weist an der Position der 162. Base eine Adenin-Insertion auf, darauffolgend findet sich ein zusätzlicher Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position der 168. Base. Durch diese resultierende Frameshift-Mutation entsteht ein neues Stopp-Codon, so dass das Produkt des Pseudogens lediglich 54 Aminosäuren lang sein kann. Man geht deswegen davon aus, dass das Pseudogen keine Relevanz für die Proteinsynthese hat (Ling et al. 1997).

TUFM wird im Cytosol der Zelle hergestellt und ist eine mitochondriale GTPase, die unter GTP-Verbrauch während der mitochondrialen Proteinsynthese die aminoacylierten tRNAs zur A-Seite des Ribosoms bringt (Wells et al. 1995; Worlax et al. 1995). Die erfolgreiche Paarung Codon:Anticodon bewirkt die hydrolytische Spaltung von GTP (Guanosintriphosphat). *TUFM* formt den ternären Komplex in Mitochondrien. Die Biosynthese mitochondrialer Proteine ist ohne *TUFM* nicht möglich (Valente et al. 2009). Bestimmte Mutationen in *TUFM* führen zu einer Funktionseinschränkung und somit zwangsläufig zu einer verringerten oder ausbleibenden Bildung des ternären Komplexes (Valente et al. 2009).

TUFM hat außerdem unter Zellstress die Funktion eines Chaperons (Montanari et al. 2013). Es ähnelt dem entsprechenden Gen in Menschenaffen zu über 98% (nach *Ensembl Build 84* - veröffentlicht im März 2016 [<http://www.ensembl.org/index.html>], ermittelt mit dem „BLAST - Basic Local Alignment Search Tool“ [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], Kent 2002, zuletzt abgerufen am 09.07.2016). *TUFM* wird stark in allen Geweben mit hoher oxidativer Metabolismusrate exprimiert, wie Leber, Niere, Herz, Gehirn und einigen Tumor-Entitäten. Niedrige Raten an *TUFM* findet man in der Milz, dem Pankreas und der Muskulatur (Wells et al. 1995). In der Literatur sind zurzeit insgesamt 85 synonyme, 128 Missense und 3 Loss-of-function Mutationen in *TUFM* beschrieben (Daten des ExAC-Browsers des Broadinstitutes [<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000178952>], Lek et al. 2015, zuletzt abgerufen am 09.07.2016).

1.7.2.2 Eignung als Kandidatengen und aktueller Forschungsstand

Wie in Abschnitt 1.6.6 „GWAS und ihr Beitrag zur Identifikation möglicher Kandidatengene“ (S.18) bereits dargestellt wurde, konnte durch Arbeiten von Speliotes et al. (2010) und Locke et al. (2015) gezeigt werden, dass die chromosomale Region 16p11.2 mit Adipositas assoziiert ist. Mehrere genomische Loci, darunter *SH2B1*, *SULT1A1*, *SULT1A2*, *APOBR48* und *TUFM*, liegen in hohem LD zum SNP rs7359397, der mit Adipositas positiv assoziiert ist (siehe auch Abbildung 1.3 auf S.19). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in den Jahren 2011 bis 2014 die chromosomale Region 16p11.2 auf das Vorliegen von möglichen Mutationen, die das Auftreten von extremer Adipositas im Kindes- und Jugendalter erklären könnten. Die Ergebnisse dieses Mutationsscreenings wurden gemeinsam von Volckmar et al. (2015) veröffentlicht und zeigten, dass den Genen *SH2B1* und *APOBR* eine Beteiligung an der Entstehung von Adipositas zugeschrieben werden kann (Volckmar et al. 2015).

Varianten im Genom von *TUFM* liegen zum SNP rs7359397 in hohem Kopplungsungleichgewicht (*TUFM* rs12928404, $r^2 = 0,98$, Speliotes et al. 2010). Mutationen in *TUFM* führten bei zwei in der Literatur beschriebenen Patienten zu einem Defizit der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien mit mangelhafter Energiegewinnung, was zu einer progressiven Lactatazidose mit fataler infauster Enzephalopathie führte. Ursächlich führte eine Punktmutati-

tion (Cytosin zu Thymin) an Position 139 der Basenabfolge zur Entstehung eines Stopp-Codons, so dass ein zu kurzes Protein entstand (Valente et al. 2007). Eine Formung des ternären Komplexes in Mitochondrien war somit nicht mehr möglich, so dass es in der Folge bei diesen Patienten zu einer mitochondrialen Enzephalopathie kam (Valente et al. 2009).

Weiterhin sind Interaktionen mit der Regulation der Expression von Interferon-1 beschrieben. *TUFM* vermittelt eine Abschwächung der Immunantwort auf die betroffene Zelle und führt zu verminderter Phagozytose der Zelle (Lei et al. 2012). *TUFM* schützt außerdem mutierte mtDNA (mitochondriale DNA) vor dem Abbau, was seine Überexpression in verschiedenen Tumor-Zellen erklären könnte (Belostotsky et al. 2012; Shi et al. 2012; Wells et al. 1995). *TUFM* wird bei Mäusen, die eine äußerst fettreiche Kost erhielten, im Fettgewebe, den Muskeln und der Leber überexprimiert (Gutierrez-Aguilar et al. 2012). Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer Inversion auf Chromosom 16p11.2 und einem erhöhten Risiko für Übergewicht und Asthma, wobei *TUFM* von allen Genen in der Region am deutlichsten ($p = 3 \times 10^{-40}$) in Lymphoblasten überexprimiert war (Gonzalez et al. 2014). Bei Mäusen, die einer kalorienreichen Diät ausgesetzt waren, ist *TUFM* in den Mitochondrien der Unterschenkel-Muskeln signifikant weniger vorhanden als bei Mäusen, die normale Kost erhalten. Erst durch intensive körperliche Aktivität steigt die Konzentration von *TUFM* in den Mitochondrien wieder an und wird bei anhaltendem Training sogar signifikant höher als bei Mäusen, die normal ernährt wurden und das gleiche Training absolvieren. Dieser Befund deutet darauf hin, dass körperliche Aktivität vorausgegangene negative Effekte einer hochkalorischen Diät kompensieren kann und über einen längeren Zeitraum hinweg positive Effekte hat. *TUFM* ist als integraler Bestandteil der mitochondrialen Proteinsynthese direkt an der Funktionsfähigkeit und Leistung der Mitochondrien beteiligt (Lee et al. 2016). *TUFM* ist nach den Daten des „GWAS-Katalogs“ (GWAS Catalog - The NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies [<http://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=tufm>], Welter et al. 2014, zuletzt abgerufen am 20.08.2016) durch mehrere GWAS mit den Merkmalen Adipositas und dem Bildungsgrad (*engl.* educational attainment) assoziiert (Rietveld et al. 2013; Rietveld et al. 2014).

Es stellt sich daher die Frage, welche Rolle *TUFM* in der komplexen multifaktoriellen Genese der Adipositas spielt.

1.8 Ziele der Arbeit

Nachdem durch die Arbeit von Speliotes et al. 2010 verschiedene Bereiche im Genom identifiziert wurden, die mit Adipositas assoziiert sind, stellt sich nun die Frage, welches Gen um den SNP rs7359397 für diese Assoziation ursächlich sein könnte. Viele Fakten sprechen für *TUFM* als mögliches assoziiertes Gen. TUFM wirkt als Transkriptionsfaktor in Mitochondrien und hat dadurch großen Einfluss auf die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung. Fallberichte und tierexperimentelle Daten legen eine Beteiligung TUFMs am Energiehaushalt des Körpers nahe. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit umfasst daher folgende Punkte:

1. Finden sich Varianten in *TUFM* bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen?
2. Haben die gefundenen Varianten eine funktionelle Relevanz? (Testung *in silico*)
3. Weisen die gefundenen Varianten eine Assoziation zu Adipositas auf?
4. Können die gefundenen Varianten den GWAS-Befund erklären?

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde *TUFM* durch verschiedene molekulargenetische Verfahren in einem Kollektiv aus 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen auf mögliche Mutationen und deren Auswirkungen untersucht.

Für die Laborarbeiten wurden teilweise zwei benachbarte Exons von *TUFM* zu einem Fragment zusammengelegt, um das Screening effizienter durchzuführen. Eine Übersicht über die Fragmente und ihre korrespondierenden Exons findet sich in Tabelle 2.13 auf Seite 35. In dieser Arbeit wird auf die Ergebnisse in den Fragmenten 3,4,5 und 6 eingegangen. Diese entsprechen den Exons 3 bis 9. Die Ergebnisse der Fragmente 1,2 und 7, die den Exons 1,2 und 10 entsprechen, finden sich in der Dissertation von Frau Maria Touma geb. Göbel (Titel: Molekulargenetische Analyse am TUFM-Gen [Tu translation elongation factor mitochondrial gene] bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen), mit der dieses Screening zusammen durchgeführt wurde (Touma 2016). Das Screening und die Laborarbeiten fanden vom Dezember 2011 bis Juni 2012 statt.

2 Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

Das untersuchte Kollektiv setzte sich aus extrem adipösen Kindern und Jugendlichen zusammen und wurde im Vorfeld der Arbeit erhoben. Mit allen Probanden und ggf. ihren Eltern wurden strukturierte Interviews zur Sozialanamnese, körperlichen Entwicklung inklusive Gewichtsverlauf und zu organischen Störungen geführt. Es wurde über die Hintergründe, Ziele und Durchführung der Studie aufgeklärt und aufkommende Fragen ausreichend beantwortet. Alle Probanden und bei Minderjährigen zusätzlich die verantwortlichen Erziehungsberechtigten gaben ihre Einverständniserklärung zur Teilnahme am Kollektiv. Ein positives Votum der Ethikkommissionen der beteiligten Kliniken liegt vor.

Für alle Teilnehmer gelten die unter Punkt 2.1.1 dargelegten Kriterien (Volckmar 2013).

2.1.1 Kriterien zur Teilnahme an der Studiengruppe

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch Mitarbeiter an folgenden Kliniken:

- Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Philipps-Universität Marburg
- Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen
- Vestische Kinder- und Jugendklinik Datteln

Allgemeine Einschlusskriterien, die alle Probanden zu erfüllen haben:

- Ausschluss organischer Leiden, die das Körpergewicht beeinflussen
- Ausschluss einer verordneten Dauermedikation, die das Körpergewicht beeinflusst (Kontrazeptiva sind von dieser Regelung ausgenommen)
- Nikotinkonsum < 10 Zigaretten pro Tag

Einschlusskriterien der einzelnen Gruppen, abhängig vom BMI (Volckmar 2013):

- Gruppe der übergewichtigen Kinder und Jugendlichen: BMI \geq 90. Perzentile
- Gruppe der normalgewichtigen Kontrollen: BMI zwischen 40. und 60. Perzentile
- Gruppe der untergewichtigen Kontrollen: BMI \leq 15. Perzentile, zusätzlich Ausschluss einer Essstörung

2.1.2 Deskriptive Statistik

Zur Durchführung des Mutationsscreenings wurde eine Gruppe aus 95 Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas untersucht. Die Auswahl der 95 Individuen erfolgte anhand von vorher festgelegten Kriterien (Volckmar et al. 2012; Volckmar 2013): Entscheidend war der

vorliegende Genotyp im SNP rs2008514, der in unmittelbarer Nachbarschaft zum SNP rs7359397 liegt. Dieser SNP ist in den GWAS mit Adipositas assoziiert (Locke et al. 2015; Speliotes et al. 2010). Die 90 extrem adipösen Individuen waren alle homozygot für das Risiko-Allel Thymin im SNP rs2008514 und hatten mindestens ein heterozygotes Elternteil, welches überzufällig häufig das Thymin-Allel weitervererbte (Volckmar et al. 2012; Volckmar 2013). Die anderen fünf Individuen waren alle heterozygot im Bereich des SNPs. Bei dem Screening handelte es sich daher nicht um eine normalverteilte repräsentative Kohorte. Eine Übersicht über die Phänotypen der 95 Individuen findet sich in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1 Phänotypen der 95 Individuen des Mutationsscreenings (nach Volckmar et al. 2012; Volckmar 2013)

| Anteil männlicher Individuen | Alter (Mittel + Standardabweichung) in Jahren | BMI (Mittel + Standardabweichung) in kg/m ² |
|------------------------------|---|--|
| 48.42 % | 13.43 ± 3.37 | 31.87 ± 5.04 |

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

Tabelle 2.2 Auflistung der verwendeten Geräte

| Genaue Gerätebezeichnung | Funktion | Hersteller |
|--------------------------|--|---|
| PL 3002 | Analysewaage | Mettler-Toledo (Gießen, D) |
| Varioklav 300 E | Autoklav | H+P Labortechnik AG (Oberschleißheim, D) |
| Transgenomic Wave® | dHPLC-Gerät | Transgenomic (Cheshire, UK) |
| DNA-Engine | DNA-Thermocycler (Gradientencycler) | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| PTC-100 | DNA-Thermocycler | MJ Research (Waltham, USA) |
| PTC-200 | DNA-Thermocycler (Gradientencycler) | MJ Research (Waltham, USA) |
| Veriti | DNA-Thermocycler (Gradientencycler) | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| Comfort NoFrost | Eisschrank | Liebherr (Lienz, A) |
| Premium NoFrost | Eisschrank | Liebherr (Lienz, A) |
| Scotsman AP-80 | Eismaschine | Frimont (Mailand, I) |
| HS6686 | Eisschrank (-60 bis -85°C) | Hettich (Tuttlingen, D) |
| Pipetus forty | elektrische Saugpipette | Hirschmann (Heilbronn, D) |

| Genaue Gerätebezeichnung | Funktion | Hersteller |
|---|---|---|
| 41-2340 | Elektrophoresekammer für Agarosegele | Peqlab (Erlangen, D) |
| Hoefer SE 600 Ruby | Elektrophorese für SSCP-Gele | Amersham BioScience (Pittsburg, USA) |
| Unigeldryer 3545 D | Geltrockner | LTF Labortechnik GmbH & Co KG (Wasserburg, D) |
| Purelab Ultra | Gerät zur Herstellung von Aqua dest. | ELGA (High Wycombe, UK) |
| Haake K20 | Kühlgerät für SSCP | Kobe (Marburg, D) |
| Profiline | Kühlschrank | Liebherr (Lienz, A) |
| MR 3001 | Magnetrührgerät | Heidolph (Kelheim, D) |
| MR 3002 Silumin | Magnetrührgerät | Heidolph (Kelheim, D) |
| MR 1000 | Magnetrührgerät | Heidolph (Kelheim, D) |
| Vakuubrand MZ 2C | Membran-Vakuumpumpe | ABM (Greifenberg, D) |
| Inverter NN-T223M | Mikrowelle | Panasonic (Hamburg, D) |
| pH 315i | pH-Meter | WTW (Wellheim, D) |
| Finnpipette F2 (5-50µl) | Pipette | Thermo Scientific (Waltham, USA) |
| Pipetman (1-1000µl) | Pipette | Gilson (Middleton, USA) |
| Thermo Scientific (5-50µl) | Pipette | Thermo Scientific (Waltham, USA) |
| Tip Stack Pack | Pipettenspitzen | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Biosphere Filter Tips | Pipettenspitzen | Sarstedt (Nümbrecht, D) |
| Gyrotwister | Plattenschwenkgeräte | Labnet (Woodbridge, UK) |
| Vortex Mixer K | Schüttelgerät | Neolab (Heidelberg, D) |
| GFL 1083 | Schüttelwasserbad | GFL MWH (Burgwedel, D) |
| Nanodrop 1000 | Spectrophotometer | Peqlab (Erlangen, D) |
| G7883 | Spülmaschine | Miele (Gütersloh, D) |
| EPS 601 Power Supply | Spannungsaggregat für Agarose- und SSCP-Gelelektrophorese | Amersham BioScience (Pittsburg, USA) |
| Kelvitron T | Trockenschrank | Heraeus (Worms, D) |
| UV-Photosystem mit monochromer CCD-Kamera | UV-Leuchttisch mit Kamera, Floppylaufwerk | Peqlab (Erlangen, D) |
| P39 | Drucker für UV-Fotosystem | Mitsubishi (Tokyo, Japan) |
| Mikro 200 | Zentrifuge (klein) | Hettich (Tuttlingen, D) |
| Megafuge 1.0 | Zentrifuge (groß) | Heraeus (Worms, D) |
| Roland 460 R | Zentrifuge (groß) | Hettich (Tuttlingen, D) |

2.2.2 Chemikalien

Tabelle 2.3 Auflistung der verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|--------------|---------------------|
| 100bp Ladder | Roth (Karlsruhe, D) |

| Chemikalie | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| 100x Bovine Serum Albumin (BSA) (100µg/ml) | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| 10x Puffer | Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) |
| Acetonitril (C ₂ H ₃ N) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | Roth (Karlsruhe, D) |
| aqua bidest. | DeltaSelekt GmbH (Dreieich, D) |
| Borsäure | Roth (Karlsruhe, D) |
| Bromphenolblau | Roth (Karlsruhe, D) |
| Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) (20mM) | Peqlab (Erlangen, D) |
| Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethanol 99% (C ₂ H ₅ OH) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethylen-ediamin-tetraacetic-acid (EDTA) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ficoll Type 400 | Roth (Karlsruhe, D) |
| Formaldehyd | Roth (Karlsruhe, D) |
| Formamid deionisiert | Roth (Karlsruhe, D) |
| Glycerol | Roth (Karlsruhe, D) |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) |
| Natriumbicarbonat (Na ₂ CO ₃) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Na ₂ EDTA | Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth (Karlsruhe, D) |
| PeqGold Universal-Agarose | Peqlab (Erlangen, D) |
| Primer (25pmol/µl) | Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) |
| Pronase E (10mg/ml) | Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen (Hilden, D) |
| Salpetersäure (HNO ₃) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Salzsäure (HCL) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Silbernitrat (AgNO ₃) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Taq-Polymerase (5U/µl) | Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA) |
| Tetramethylethylendiamid (TEMED) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Triethylammoniumacetat (TEAA) | Transgenomic (Cheshire, UK) |
| Tris-HCL 99,9% (C ₄ H ₁₁ NO ₃) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Tris-hydroxymethyl-aminomethan | Roth (Karlsruhe, D) |
| Xylencyanol | Roth (Karlsruhe, D) |

2.2.3 Puffer

2.2.3.1 Puffer für die DNA-Extraktion

Tabelle 2.4 Verwendete Puffer für die DNA-Extraktion

| Puffer | Verwendete Chemikalien |
|-----------------------------------|--|
| Red cell lysis buffer (RCLB) | 10 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6 |
| SE-Puffer (Salzsäure-EDTA-Puffer) | 75 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 |
| Pronase-Reaktionsmix | 5 ml SE-Puffer 500 µl SDS (10%) 25 µl Pronase E (10 mg/ml) |
| red. TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) | 10 mM Tris-HCl 0,5 M EDTA pH 8,0 |

2.2.3.2 Standardpuffer

Tabelle 2.5 Verwendete Standardpuffer

| Puffer | Verwendete Chemikalien |
|---------|--|
| 10x TBE | 0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,0 ad 1 l aqua bidest. |
| 50x TAE | 2,0 M Tris 2,0 M Eisessig 0,05 M EDTA pH 8,3 ad 1 l aqua bidest. |

2.2.4 Puffer für die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC, Wave®)

Tabelle 2.6 Verwendete Puffer für die dHPLC

| Puffer | Verwendete Chemikalien |
|----------|---|
| Puffer A | 50 ml TEAA (2,0 M) 250 µl Acetonitril ad 1 l aqua bidest. |
| Puffer B | 50 ml TEAA (2,0 M) |

| Puffer | Verwendete Chemikalien |
|----------|---|
| | 250 ml Acetonitril ad 1 l aqua bidest. |
| Puffer C | 750 ml Acetonitril ad 1 l aqua bidest. |
| Puffer D | 80 ml Acetonitril ad 1 l aqua bidest. |

2.2.5 Chemikalien für die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP)

Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Laufgele für die SSCP

| Lösung | Verwendete Chemikalien |
|---------------|---|
| Gele für SSCP | 18,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid (40%) 2,5 ml 10xTBE ad 50 ml aqua bidest. 500 µl APS (10%) 34µl TEMED |

Tabelle 2.8 Verwendeter Auftragspuffer für die SSCP

| Puffer | Verwendete Chemikalien |
|----------------|---|
| Auftragspuffer | 8 ml EDTA (0,5 M) 190 ml Formamid (deionisiert) 2 ml Glycerin 50 mg Bromphenolblau 50 mg Xylen Zyanol |

Tabelle 2.9 Silberfärbung, verwendete Chemikalien und Reaktionsschritte

| Lösung | Verwendete Chemikalien (für 1 Liter) |
|-----------------------|---|
| I. Fixierlösungen | |
| Fixierlösung 1 | 100 ml Ethanol (10%) 5 ml Eisessig (0,5%) ad 1 l aqua bidest. |
| Fixierlösung 2 | 15 ml Salpetersäure (1%) ad 1 l aqua bidest. |
| Waschung | mit aqua bidest. |
| II. Silberlösung | 1000 ml AgNO ₃ (1%) |
| Waschung | mit aqua bidest. |
| III. Entwicklerlösung | 200 ml Na ₂ CO ₃ 514 µl Formaldehyd (0,019%) |
| IV. Stopplösung | 100 ml Eisessig (10%) ad 1 l aqua bidest. |
| V. Fixierlösung | 100 ml Glycerol (10%) ad 1 l aqua bidest. |
| Waschung | mit aqua bidest. |

2.2.6 Enzyme für den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Tabelle 2.10 Verwendete Enzyme

| Enzym | Bezugsquelle |
|--------------|------------------------------------|
| <i>EcoRI</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| <i>BstNI</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| <i>BclI</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| <i>PflFI</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| <i>Cac8I</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |
| <i>BseYI</i> | New England Biolabs (Ipswich, USA) |

2.3 Eigenanteil an der vorliegenden Arbeit

Das laborexperimentelle Mutationsscreening und die sich anschließende Genotypisierung fanden vom Dezember 2011 bis Juni 2012 statt und wurden in Zusammenarbeit mit Frau Maria Touma geb. Göbel durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Ergebnisse der Fragmente 3,4,5 und 6 (entsprechend den Exons 3 bis 9) eingegangen, die genauen Ergebnisse der Fragmente 1,2 und 7 (entsprechend den Exons 1,2 und 10) finden sich in der Promotionsarbeit (Titel: Molekulargenetische Analyse am TUFM-Gen [Tu translation elongation factor mitochondrial gene] bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen) von Frau Touma (Touma 2016). Zum besseren Verständnis wird an einigen Stellen dieser Arbeit kurz auf die Ergebnisse von Frau Touma eingegangen.

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Kollektiv bestehend aus 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen auf das Vorliegen von Mutationen in der kodierenden Region von *TUFM* untersucht. Die DNA der Individuen lag bereits vor Beginn der Arbeiten isoliert vor; zum besseren Verständnis und zur Vollständigkeit der Arbeit wird kurz auf das verwendete Protokoll eingegangen. Die für die Isolation der DNA in unserem Labor verwendeten Chemikalien finden sich ebenfalls im Materialteil in tabellarischer Form.

Folgende Arbeiten wurden selbstständig in den Exons 3,4,5,6,7,8 und 9 von *TUFM* durchgeführt:

- Design, Etablierung und Überprüfung der notwendigen Primer für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)
- PCRs zur Vervielfältigung der DNA
- Mutationsscreening mittels Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP) oder denaturierender Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC)
- Aufbereitung der vervielfältigten DNA zur kommerziellen Sequenzierung mittels des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) zum Verschicken an ein Speziallabor (LGC Genomics GmbH, Berlin)
- Auswertung der Sequenzen und Design der idealen Genotypisierungsmethode

- Genotypisierung der gefundenen Varianten mittels Polymerase-Kettenreaktion-Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP) oder Tetra-Primer Amplification-Refractory-Mutation-System-Polymerase-Kettenreaktion (ARMS-PCR)
- Bewertung der erhobenen Daten im Vergleich zu einer normalverteilten Studiengruppe und im Hinblick auf die Relevanz für die Entstehung von Adipositas, hierfür auch selbstständige Berechnung der notwendigen Statistik und der Hardy-Weinberg-Gleichgewichte

2.4 Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die Extraktion der DNA aus Blutproben der Probanden ist bereits im Vorfeld der Arbeit durchgeführt worden. Zu Beginn des laborexperimentellen Screenings lag die DNA aller 95 Individuen vor. Für diese Promotionsarbeit wurde keine DNA selbstständig isoliert. Zur Vollständigkeit der Arbeit wird jedoch kurz auf das verwendete Protokoll eingegangen. Als Referenz diente eine modifizierte Version des Protokolls nach Miller (Miller et al. 1988). Folgende Schritte sind im Vorfeld durchgeführt worden:

- Lyse der Zellmembran
- Entfernung der Zelltrümmer
- Ausfällung der Nukleinsäuren

Nach Zugabe von 30 ml eiskalter RCLB zu 10-20 ml EDTA-Blut wurde die Probe 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten erfolgte die Sedimentation der Leukozyten durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4000rpm und einer Temperatur von 4°C. Der Überstand der entstandenen Lösung wurde verworfen. Die übrige Lösung enthielt nur noch Leukozytensediment, welches erneut in 25 ml RCBL gewaschen und anschließend bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert wurde. Die entstehende Zelldispension wurde über Nacht unter Zusatz von 5,5 ml Pronase-Mix schüttelnd liegend inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 5 ml SE-Puffer für 10 Minuten unter ständigem Schütteln im Wasserbad bei 55°C. Anschließend, nach Zugabe von 2,5 ml NaCl-Lösung, wurde die nun entstandene Lösung 15 Sekunden lang gevortext. Nach sich anschließender 15 minütiger Zentrifugierung bei 4000rpm fielen die noch vorhandenen Proteine aus der Lösung aus, so dass der DNA-erhaltende Überstand unter Zusatz von reinem Ethanol gefällt werden konnte. Nach 30 Minuten konnte die DNA mit einem Haken aus der Lösung aufgenommen werden. Als letzter Schritt schloss sich die kurze Waschung der DNA in 70%-Ethanol an, bevor das Produkt in einem TE-Puffer über Nacht oder für 1-2 Stunden im Wasserbad gelöst wurde.

Vor Lagerung der DNA bei -80°C erfolgte die photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in der Probe durch Extinktion bei 260 nm und die Verdünnung der Probe bis zu einer Konzentration von 20 ng/µl. Die so hergestellten Proben konnten anschließend für sämtliche molekulargenetische Verfahren verwendet werden.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion zur in-vitro Amplifizierung der DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction* = PCR) wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt (Mullis und Faloona 1987). Die zugrundeliegende Idee ist eine Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*, so dass als Endprodukt große Mengen DNA zum Analysieren vorliegen. Benötigt werden dazu neben der Ausgangs-DNA (*template*) Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), eine thermostabile DNA-Polymerase (meist *Taq-Polymerase*; gewonnen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), Magnesium (Mg^{2+})-Ionen als Stabilisierungs- und Cofaktoren und zwei Oligonukleotid-Primer, die den Anfang und das Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts markieren. Eine Pufferlösung schafft optimale Bedingungen für die Reaktion.

2.5.1 Durchführung einer PCR

Nach Herstellen einer Lösung, die alle oben genannten Komponenten erhält, wird das Gemisch in einen Thermocycler gegeben. Hier können folgende Schritte in dieser Reihenfolge wiederholt werden, um ausreichend Endprodukt für folgende Untersuchungen aus einer PCR zu erhalten (Garibyan und Avashia 2013):

- **Denaturierung:** Bei Temperaturen um 94°C bilden sich die komplementären Einzelstränge der DNA.
- **Primeranlagerung (Annealing):** Das Gemisch wird auf die optimale Anlagerungstemperatur T_{Ann} der Primer abgekühlt. Bei dieser Temperatur binden die vorher synthetisierten Primer optimal an die DNA. Die Primer sind komplementär zu kurzen Abschnitten der DNA (der Vorwärtsprimer definiert hierbei das 5'Ende des Stranges, der Rückwärtsprimer das 3'Ende des Stranges) und rahmen den zu amplifizierenden Bereich der DNA ein.
- **Synthese des Endprodukts (Strangelongation):** Nach Erhitzen des Gemisches auf ca. 72°C (Reaktionsoptimum der *Taq-Polymerase*) beginnt die hitzestabile Polymerase mit der Verlängerung des DNA-Stranges, ausgehend vom 3'Ende der angelagerten Primer. Der synthetisierte Strang dient im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize, so dass im Verlaufe der weiteren Zyklen das gewünschte Endprodukt exponentiell entsteht.

Häufig wird nach Abschluss der PCR der Cycler auf 4 - 8°C abgekühlt, um das Produkt stabil zu halten. So ist es z.B. auch möglich, eine PCR über Nacht laufen zu lassen.

2.5.2 PCRs für das *TUFM*-Gen

Verschiedene Optimierungen wurden angewandt, um die Ausbeute der PCRs für *TUFM* zu erhöhen. Neben optimalen Reaktionsbedingungen wurden die idealen Annealing-Temperaturen für die Primer experimentell herausgefunden; zudem wurde das Standard-PCR-Protokoll ergänzt und erweitert, um valide und reliable Ergebnisse für *TUFM* erzielen zu können.

2.5.2.1 Design der Primer

Ideale Primer für eine PCR sind wie folgt aufgebaut (Chuang et al. 2013):

- **Primerlänge:** Die ideale Länge eines PCR-Primers liegt zwischen 16 – 28 Nukleotiden (nt), wobei sich Vorwärts- und Rückwärtsprimer in der Länge nicht um mehr als 3 nt unterscheiden sollten.
- **Gehalt an Guanin und Cytosin:** Der Gehalt an den Basen G und C sollte zwischen 40 – 60% liegen.
- **Annealing-Temperatur:** Die besten Resultate lassen sich mit Primern erzielen, die exakt dieselbe T_{Ann} haben. Idealerweise liegen zwischen den beiden Annealing-Temperaturen nicht mehr als 5°C. Eine einfache Formel zur Berechnung der T_{Ann} eines Primers ist die Formel nach Wallace (Wallace et al. 1979): $T_{Ann} = 2(A+T) + 4(G+C)$, wobei jeweils die Anzahl der verschiedenen Basen (A,T,G,C) im Primer berücksichtigt wird. Bei sich unterscheidender T_{Ann} der Primer wurde im Rahmen der Arbeit die ideale Annealing-Temperatur, ausgehend vom Mittelwert, experimentell ermittelt.
- **Sekundärstrukturen:** Die Primer sollten untereinander bzw. mit sich selbst keine Sekundärstruktur ausbilden.
- **Zielstruktur:** Der Bereich, an den der Primer bindet, sollte möglichst spezifisch sein. Pseudogene oder Bereiche, in denen der Primer ebenfalls bindet, sollten vor der Synthese der Primer identifiziert werden und das Design der Primer entsprechend angepasst werden.

Eine Möglichkeit, alle diese Aspekte zu berücksichtigen, findet sich in verschiedenen, online verfügbaren Primer-Design-Programmen, wie z.B. BatchPrimer3 (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>), welches für das Primer-Design in dieser Arbeit verwendet wurde (You et al. 2008). Eine Übersicht über die verwendeten Primer und die zugrundeliegende Sequenz von *TUFM* findet sich im Anhang (Abschnitt 7.1 „Verwendete Sequenz von *TUFM* und Primerpositionen“ auf S.91).

2.5.2.2 Mg^{2+} -Konzentration in einer PCR

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen ist Magnesium ein wichtiger Cofaktor. Magnesium formt lösliche Komplexe aus dNTPs und DNA. Ohne Magnesium arbeitet die *Taq-Polymerase*

nicht, zu wenig Magnesium führt zu einer verringerten Anzahl an Endprodukt. Zu viel Magnesium verringert die Genauigkeit der Polymerase und kann die Anzahl an unspezifischen Amplifikationen erhöhen (Eckert und Kunkel 1990; Ellsworth et al. 1993; Williams 1989). Die ideale Konzentration an Magnesium liegt zwischen 1,0 – 4,0 mM und wurde experimentell in der Etablierung der PCR für jedes Fragment ermittelt. Eine Übersicht über die idealen MgCl_2 -Bedingungen und Annealing-Temperaturen der Fragmente liefert Tabelle 2.14.

2.5.3 PCR-Protokolle für die Durchführung dieser Arbeit

Tabelle 2.11 Standardreaktionsansatz für eine PCR

| Reagenz | Menge pro 25 µl Ansatz |
|-------------------------------|------------------------|
| DNA (20 ng/µl) | 2,5 µl |
| PCR-Puffer (10x) | 2,5 µl |
| MgCl_2 (25 mM) | 1 - 2 µl |
| Vorwärts-Primer (25 pmol/µl) | 2,5 µl |
| Rückwärts-Primer (25 pmol/µl) | 2,5 µl |
| dNTPs (20 mM) | 2,5 µl |
| Taq-Polymerase (5 U/µl) | 0,1 - 0,3 µl |
| Aqua bidest. | ad 25 µl |

Tabelle 2.12 Standardreaktionsbedingungen für eine PCR

| Schritt | Zyklen | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|-------------|---------------------|
| initiale Denaturierung | 1 Zyklus | 5 Minuten | 95°C |
| Denaturierung | 30 Zyklen | 30 Sekunden | 95°C |
| Annealing | | 30 Sekunden | T_{Ann} °C |
| Elongation | | 30 Sekunden | 72°C |
| finale Elongation | 1 Zyklus | 5 Minuten | 72°C |
| Kühlung | | ∞ | 4°C |

Ausgehend von diesen Standard-Protokollen wurde mit jedem zu untersuchenden Fragment von *TUFM* vorher eine Etablierungs-PCR durchgeführt, in der verschiedene Reaktionsbedingungen getestet wurden. Die optimale MgCl_2 -Konzentration und die optimale Annealing-Temperatur wurden mittels verschiedener MgCl_2 -Konzentrationen und einem Gradienten-Cycler ermittelt. Auf Grundlage dieser Etablierungs-PCR wurden die Fragmente später vervielfältigt. Um das Screening effizienter durchzuführen, wurden teilweise zwei Exons von *TUFM* zu einem Fragment zusammengelegt. So wurden bessere Reaktionsbedingungen für die PCR geschaffen und die Anzahl der möglichen Fehlerquellen konnte reduziert werden (siehe Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13 Exons und daraus resultierende Fragmente mit ihrer Länge in bp von *TUFM* (die **fettgedruckten** Fragmente und Exons wurden im Rahmen dieser Arbeit betrachtet)

| Exon | Fragment | Länge |
|----------------|---------------|---------------|
| <i>Exon 1</i> | <i>Frg. 1</i> | 329 bp |
| <i>Exon 2</i> | <i>Frg. 2</i> | 316 bp |
| Exon 3 | Frg. 3 | 298 bp |
| Exon 4 | Frg. 4 | 484 bp |
| Exon 5 | | |
| Exon 6 | Frg. 5 | 487 bp |
| Exon 7 | | |
| Exon 8 | Frg. 6 | 462 bp |
| Exon 9 | | |
| <i>Exon 10</i> | <i>Frg. 7</i> | 473 bp |

Tabelle 2.14 Ideale $MgCl_2$ -Bedingungen und Annealing-Temperaturen der Fragmente

| Fragment | $MgCl_2$ - Konzentration | T_{Ann} |
|-------------|--------------------------|-----------|
| TUFM Frg. 3 | 1,0 mM | 58,3°C |
| TUFM Frg. 4 | 2,0 mM | 64,8°C |
| TUFM Frg. 5 | 2,0 mM | 59,7°C |
| TUFM Frg. 6 | 1,0 mM | 58,3°C |

2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Abschluss der PCR wurde zur Überprüfung der synthetisierten DNA-Fragmente eine Gelelektrophorese durchgeführt. Bei diesem Verfahren wandern die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe durch ein elektrisches Feld und werden so ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch das gleichzeitige Mitlaufenlassen eines Basenpaar-Längenmarkers kann die Größe der DNA-Fragmente unter UV-Licht bestimmt werden (Helling et al. 1974).

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt von mehreren Faktoren ab. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren sind bei neutralem pH, wie er im Gel vorliegt, negativ geladen. Sie laufen daher zur Anode. Die Wegstrecke, die sie dabei zurücklegen, ist hierbei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare und somit zur Länge des zu untersuchenden Fragments (Helling et al. 1974).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Laufgeschwindigkeit ist die Porendichte des Gels. Je höher die Agarose-Konzentration ist, desto feiner ist die Matrix des Gels und desto höher ist die Trennschärfe für die Länge der Fragmente. In dieser Arbeit wurde bis auf eine Ausnahme in Fragment 5 nur mit 2,5%-Agarosegelen gearbeitet.

2.6.1 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 2,5%- Agarosegels wurden 16g Agarose und 600ml TAE-Puffer benötigt. Nach Aufkochen der Agarose im Puffer und dem abschließenden Abkühlen auf 60°C

wurde Ethidiumbromid zugesetzt, eine Substanz, die mit den unpolaren Anteilen der Nukleinsäuren interferiert und die DNA unter UV-Licht sichtbar macht (Lee et al. 2012).

Darauffolgend wurde eine Gelmatrix gegossen, in der Kämme eingesetzt wurden, so dass sich im fertigen Gel Taschen zur DNA-Auflagerung bilden. Nach Erkalten des Gels wurden diese Kämme entfernt und das fertige Gel mit ausreichend TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden zusammen mit einem Puffer, der das Diffundieren der Proben verhindern soll, in die Taschen aufgetragen. Ein Längenmarker lief ebenfalls mit. Nach Anlegen einer Spannung von 240 Volt konnten, je nach Fragestellung nach einer Laufzeit von 20 Minuten oder zwei Stunden, die Proben unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und beurteilt werden.

2.7 Methoden des Mutationsscreenings

2.7.1 Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP)

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse (= *single stranded conformation polymorphism analysis*, SSCP) dient der Detektion von Polymorphismen (wie z.B. Basenaustausche, Deletionen) in einem DNA-Strang (Orita et al. 1989). Die beste Sensitivität wird bei Fragmenten mit einer Länge bis 200 bp gefunden und liegt bei ca. 95%. Es wird außerdem empfohlen, zwei verschiedene Laufbedingungen zum Screening zu benutzen, da sich die Sensitivität nochmals erhöht (Sheffield et al. 1993). Zur Herstellung von Fragmenten mit idealer Länge bietet sich ein Restriktionsverdau im Vorfeld der SSCP an, der ein längeres, z.B. mit einer PCR vervielfältigtes DNA-Fragment in die optimale Länge schneidet.

Das zugrunde liegende Prinzip der SSCP beruht auf einer Detektion von veränderten Sekundärstrukturen einer zu untersuchenden DNA aufgrund einer mutierten Nukleotidabfolge. Die DNA-Doppelstränge werden denaturiert und nehmen während des schnellen Abkühlens eine intramolekulare Sekundärstruktur an. Bei gleicher Basensequenz entstehen gleiche Sekundärstrukturen, bei einer veränderten Struktur können hingegen völlig anders konfigurierte Sekundärstrukturen entstehen. Trägt man die DNA auf ein Gel auf und legt eine Spannung an, wandern diese Sekundärstrukturen unterschiedlich weit und lassen sich durch anschließende Silberfärbung darstellen. Auffällige Bandenmuster können auf Varianten hindeuten, woraufhin die entsprechende DNA-Probe über eine Sequenzierung nach Sanger genauer analysiert wird. Der Vorteil dieses Verfahrens ist seine kostengünstige Anwendung bei gleichzeitig großem Durchsatz an DNA-Proben.

2.7.1.1 Durchführung der SSCP bei TUFM

Die Fragmente 2 und 3, entsprechend den Exons 2 und 3, wurden im Rahmen des Mutationsscreenings mit SSCP untersucht. Die genauen Bedingungen für Exon 2 finden sich bei Frau Touma (Promotionsarbeit an der hiesigen Medizinischen Fakultät). Die Herstellung der Gele mit den benötigten Chemikalien erfolgte gemäß Tabelle 2.7. Danach wurde der Gel-Ansatz

zwischen zwei Glasplatten gegossen und auf der Oberseite ein Kamm eingesetzt, der die späteren Taschen für die DNA-Proben formte. Nach Abkühlen des Gels über Nacht wurde der Kamm entfernt und jeweils 10 µl der amplifizierten und vorher verdauten DNA-Fragmente (siehe Tabelle 2.15) zusammen mit jeweils 10 µl eines Auftragspuffers (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 2.8) bei 95°C im Thermo-Cycler denaturiert. Ein Verdau vor Durchführung der SSCP war bei Exon 3 notwendig, um eine optimale Produktgröße für die SSCP herzustellen. Für die genauen Eigenschaften des für den Verdau verwendeten Enzyms *BccI* siehe Tabelle 2.16. Zur Überprüfung des erfolgreichen Verdau wurden anschließend einige Proben per Gelelektrophorese aufgetragen und ihre Länge in bp überprüft.

Tabelle 2.15 Verdau für die SSCP durch das Enzym *BccI* für *TUFM* Exon 3

| Fragment | Eduktgröße | Enzym | Produktgröße |
|-------------|------------|-------------|------------------|
| TUFM Frg. 3 | 298 bp | <i>BccI</i> | 147 bp u. 151 bp |

Tabelle 2.16 Schnittstelle (rot markiert), verwendeter Puffer und Restriktionsbedingungen des Enzyms *BccI* für den Verdau für die SSCP von *TUFM* Exon 3

| Schnittstelle | Puffer | Restriktionsbedingungen |
|--|-------------------------------|---|
| 5'...CCATC(N) ₄ ...3' 3'...GGTAG(N) ₅ ...5' | NEBuffer 1 + 100 µg/ml BSA | Inkubieren: bei 37°C über Nacht Deaktivieren: bei 65°C für 20 Min. |

Zur Verhinderung der Renaturierung wurden die Proben nach der Denaturierung umgehend auf Eis gestellt und jeweils 10 µl der hergestellten Lösung in die einzelnen Taschen pipettiert. Die Gele mit den enthaltenen Proben wurden daraufhin in die Elektrophorese-Kammer gestellt und, zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität, bei jeweils 2 Temperaturen, Zimmertemperatur und 4°C, unterschiedlichen Laufzeiten und unterschiedlichen Spannungen untersucht (siehe Tabelle 2.17).

Tabelle 2.17 Laufbedingungen für *TUFM* Exon 3

| Fragment | Lauftemperatur | Laufzeit | Spannung |
|-------------|----------------|----------|----------|
| TUFM Frg. 3 | RT | 3 h | 500 V |
| | 4°C | 19 h | 180 V |

Nach Abschluss des Laufes wurden die Banden per Silberfärbung sichtbar gemacht (Ablauf und Chemikalien siehe Tabelle 2.9) und die Gele in einem Vakuumtrockner ca. 3 Stunden lang zur nachfolgenden Auswertung getrocknet. Da die resultierenden Gele von Fragment 3 trotz Abänderungen am Versuchsablauf äußerst schwer zu interpretieren waren, erfolgte nach einigen Versuchen das weitere Mutationsscreening mittels dHPLC.

2.7.2 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (= *denaturing high-performance liquid chromatography*, dHPLC) ist, wie die SSCP, ein auf PCR-Produkten basierendes Verfahren. Es eignet sich zur schnellen und kostengünstigen Detektion von Mutationen (Hayward-Lester et al. 1995; Underhill et al. 1997) und kann Hinweise auf eine DNA liefern, die ein aussichtsreicher Kandidat für eine nachfolgende Sequenzierungsanalyse ist. Die dHPLC beruht im Wesentlichen auf der Unterscheidung zwischen Homoduplexen, die in ihrer komplementären Sequenz vollständig übereinstimmen, und Heteroduplexen, die bis auf eine Variante übereinstimmen.

Die bei diesem Verfahren angewandte Chromatographie wird auch als Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie mit einer stationären unpolaren Phase, bestehend aus alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol-Partikeln, und einer mobilen Phase, bestehend aus Triethylammonium-Acetat (TEAA), bezeichnet (siehe auch Tabelle 2.6). Die negativ-geladenen Phosphatgruppen der zu untersuchenden DNA können über die positiv-geladenen Ammonium-Ionen des TEAA an die Chromatographiesäule binden und werden mit steigender

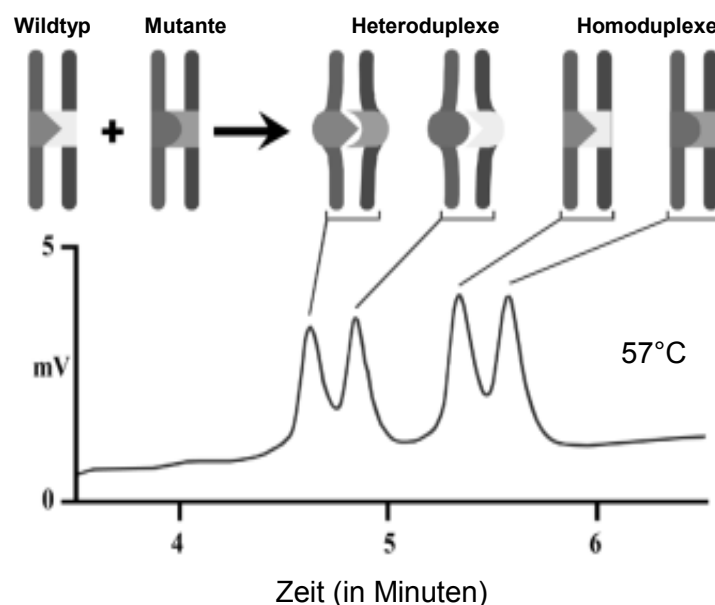


Abbildung 2.1 Absorptions-Zeit-Chromatogramm (untere Bildhälfte) und schematische Darstellung der Entstehung der Peaks. Nach Denaturierung lagern sich die Einzelstränge zu Hetero- oder Homoduplexen zusammen. Die Heteroduplexe lösen sich aufgrund geringerer elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Säule früher und werden früher detektiert (Abbildung entnommen und mit deutscher Achsenbeschriftung versehen nach Frueh und Noyer-Weidner 2003, ©2003 Walter de Gruyter Verlag, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt).

Konzentration des zugegebenen Acetonitrils der Basenpaaranzahl nach von der Säule gelöst (Underhill et al. 1997), wobei längere Fragmente länger an der Säule haften bleiben als kürzere (Angabe der Laufzeit der Fragmente in Minuten).

Vor Beginn der dHPLC amplifiziert und denaturiert man ein PCR-Produkt, so dass sich dieses in seine Einzelstränge auftrennt. Durch langsames Abkühlen lagern sich diese Einzelstränge wieder zu komplementären Doppelsträngen zusammen. Trägt ein Allel jedoch einen Basenaustausch, geschieht keine vollständige Aneinanderlagerung mehr (Heteroduplex); liegt kein Austausch vor, gelingt eine vollständige Aneinanderlagerung (Homoduplex). Trägt man dieses DNA-Gemisch, welches 1:1 aus dem Wildtyp und der Mutante besteht, anschließend auf die

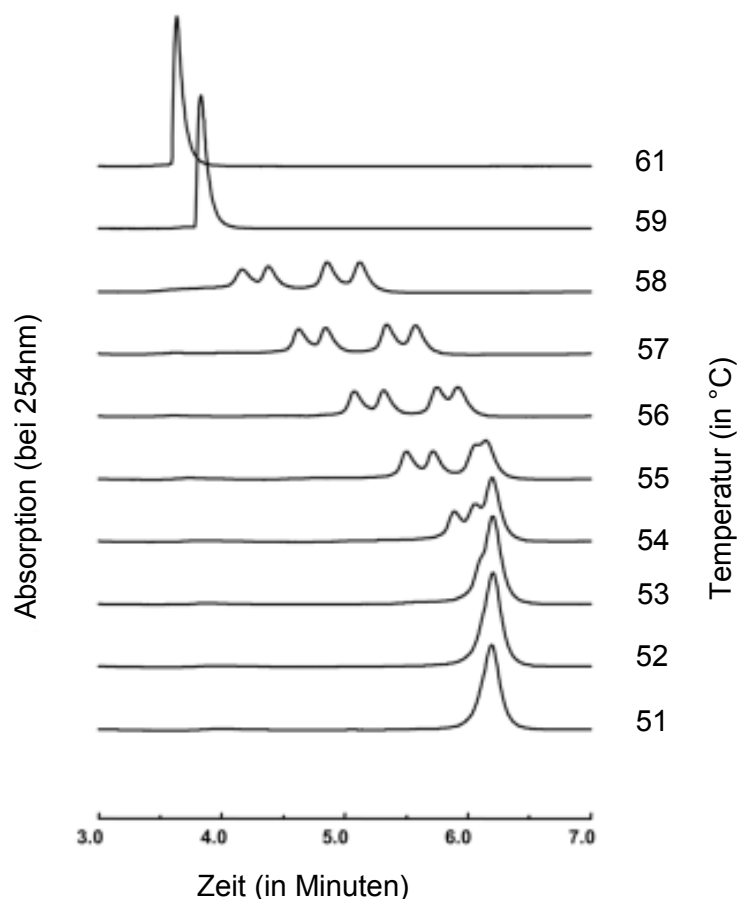


Abbildung 2.2 Absorptions-Zeit-Chromatogramm in Abhängigkeit von der idealen Schmelztemperatur. Zwischen 58°C und 54°C eluiert die heterozygote Variante gut abgrenzbar vom Homoduplex des Wildtyps (für diese Grafik wurde eine Punktmutation Adenin zu Guanin an Position 168 einer 208 bp langen Sequenz betrachtet, Abbildung entnommen, mit Temperaturangaben und deutschen Achsenbeschriftungen versehen nach Frueh und Noyer-Weidner 2003, ©2003 Walter de Gruyter Verlag, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt).

Säule auf, lassen sich die Heteroduplices aufgrund ihrer nicht vollständigen Aneinanderlagerung und somit lockereren Bindung an die Ammonium-Ionen leichter von der Säule eluieren und werden eher detektiert. Die Detektion erfolgt mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die abschließende Auswertung erfolgt mithilfe eines Computerprogrammes, das ein Absorptions-Zeit-Chromatogramm erstellt (siehe Abbildung 2.1, Frueh und Noyer-Weidner 2003). Das Chromatogramm zeigt maximal vier Peaks, wovon die ersten beiden den Heteroduplex-Peak und die letzten beiden den Homoduplex-Peak darstellen. Enthält die Mutante allerdings einen Basenaustausch, der zu einer homozygoten Variante führt, resultiert in der Praxis leider oft ein etwas schwer zu interpretierender Befund, da der Wildtyp der Mutante morphologisch ähnelt (Frueh und Noyer-Weidner 2003). Oftmals ist dann nur ein etwas verbreiteter Peak oder ein kleiner, zusätzlicher Peak auf dem Homoduplex-Peak zu sehen (oft bezeichnet als „Schulter“ auf dem Homoduplex-Peak). Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Elution von der Säule ist der Schmelzpunkt der Hetero- und Homoduplices. Der ideale Schmelzpunkt ist abhängig von der Länge des zu untersuchenden DNA-Fragments und der Anzahl der Purin- bzw. Pyrimidinbasen. Aufgrund geringerer Basenpaarungen ist der Schmelzpunkt bei den Heteroduplices geringer. Es gibt verschiedene Computer-Programme, die die Berechnung des genauen Schmelzpunktes anhand der DNA-Sequenz ermöglichen, jedoch muss meist zusätzlich experimentell versucht werden genau den einen Schmelzpunkt zu ermitteln, an dem die Heteroduplices denaturieren und von der Säule abgewaschen werden. Meist liegt dieser zwischen 51°C und 61°C (Frueh und Noyer-Weidner 2003). Die Abhängigkeit des Analyseergebnisses von der Schmelztemperatur zeigt exemplarisch Abbildung 2.2.

2.7.2.1 Durchführung der dHPLC bei TUFM

Zur Untersuchung der Fragmente 1,3,4,5,6 und 7, entsprechend den Exons 1,3,4,5,6,7,8,9 und 10, wurde im Rahmen dieser Arbeit das WAVE®-System von Transgenomic (Transgenomic Limited, Glasgow, UK) verwendet. Die genauen Bedingungen für die Fragmente 1 und 7 finden sich bei Frau Touma (Promotionsarbeit an der hiesigen Medizinischen Fakultät). Zu Beginn wurde eine Probe, die durch eine vorangegangene Sequenzanalyse eindeutig als Wildtyp identifiziert wurde, auf der dHPLC etabliert und das charakteristische Bandenmuster gespeichert.

Zum Mutationsscreening wurden die entsprechenden DNA-Proben amplifiziert, bei 95°C denaturiert und danach langsam über 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden jeweils 5 µl des PCR-Produkts auf eine 96-Well Platte pipettiert und vorsichtig in die entsprechende vorgeheizte Apparatur des WAVE®-System gestellt. Die vorher experimentell ermittelten Ablaufprogramme mit den jeweiligen Temperaturen wurden über die WAVEmaker® Software (Version 4.0, Transgenomic Limited, Glasgow, UK) gestartet. Die genauen Bedingungen und die zur endgültigen Mutationsanalyse verwendeten Temperaturen sind in Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18 Verwendete Programme und ideale Temperaturen für die Analyse von Fragmenten in *TUFM* durch das WAVE®-System

| Fragment | WAVEmaker® Programm | Ideale Temperatur |
|-------------|---------------------|-------------------|
| TUFM Frg. 3 | TUFM F3 | 57,8°C |
| TUFM Frg. 4 | TUFM F4 | 58,0°C |
| TUFM Frg. 5 | TUFM F5 neu | 61,0°C und 61,5°C |
| TUFM Frg. 6 | TUFM F6 | 59,0°C |

Der reibungslose Einsatz der dHPLC erfordert mehrere Pufferlösungen. Puffer A und B dienen zur Erzielung des Acetonitril-Gradienten, der mit der Laufzeit der dHPLC stärker wird, um die DNA von der Säule zu waschen und zu analysieren. Der 8% enthaltene Acetonitril Puffer C diente der Waschung der Säule zwischen 2 Probendurchläufen; der 75%ige Puffer D (genaue Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 2.6) zur Reinigung der kompletten Säule in festgelegten Intervallen, um sämtliche DNA-Reste rückstandlos zu entfernen (Wandolski 2010).

Anschließend wurden die resultierenden Peaks mit dem vorher gespeicherten Wildtyp-Muster verglichen. Dieser Vergleich erlaubte eine Aussage über mögliche Varianten in den eben getesteten Proben und identifizierte mögliche aussichtsreiche Kandidaten für die folgende Sequenzierung.

2.7.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Um die genaue Abfolge der Basenpaare feststellen zu können, wurde das modifizierte Sequenzierungsverfahren nach Sanger angewandt (Sanger et al. 1977). Markierte Sanger ursprünglich seine Nukleotide noch radioaktiv, wird heute ein Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden angewandt (Prober et al. 1987). Das auch als Kettenabbruch-Methode bezeichnete Verfahren benötigt insgesamt 4 Ansätze, wobei in jedem Ansatz derselbe spezifische Primer, DNA-Polymerase, die zu sequenzierende DNA und ausreichend Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) enthalten sind. Jeweils eine Base in den 4 Ansätzen liegt jedoch nur als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) vor. Bei ddNTPs ist der Zucker (Ribose) an der 2'- und 3'-Stelle desoxygeniert, wodurch die DNA-Ketten-Synthese an dieser Stelle abbricht. Es entstehen nach PCR-Durchführung DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die alle mit einer fluoreszierenden Base enden. Diese Fragmente werden über eine Gelelektrophorese oder Kapillaren aufgetrennt und anschließend über ihre fluoreszierenden Eigenschaften sichtbar gemacht. Man erhält die gesuchte Basenabfolge und etwaige Mutationen können abgelesen werden (Sanger et al. 1977).

2.7.3.1 Durchführung der Sanger-Sequenzierung bei *TUFM*

Auf der Suche nach Mutationen in *TUFM* wurde vor Beginn des Mutationsscreenings eine DNA-Probe mit mutmaßlichem wildtypischen Genotyp kommerziell bei LGC Genomics GmbH,

Berlin, sequenziert. Dieser Wildtyp wurde genutzt, um ihn als Vergleich beim Mutationsscreening mithilfe der SSCP und der dHPLC mitlaufen zu lassen. Auffällige Proben, die sich in ihrem Muster vom Wildtyp unterschieden, wurden mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufbereitet und zum Sequenzieren an ein Speziallabor verschickt (LGC Genomics GmbH, Berlin). Pro Probe erfolgten 2 Sequenzierungen, einmal mit dem Vor- und einmal mit dem Rückwärtsprimer, um Sequenzierungsfehler zu verringern. Die resultierende Basenabfolgen konnte als Datei heruntergeladen und mittels Software (DNASTar Version 10.1.0, Lasergene, Madison, Wisconsin, USA, Burland 2000) eingesehen werden. Es erfolgte daraufhin eine unabhängige Begutachtung des Basenmusters durch zwei Personen (siehe hierzu auch Volckmar 2013).

2.8 Methoden der Genotypisierung

2.8.1 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Zur Überprüfung einer gefundenen Mutation wurde die Restriktionsfragmentlängen-Analyse durchgeführt. Sie erlaubt relativ einfach und kostensparend mehrere Proben auf das Vorliegen einer Mutation zu untersuchen. Man benötigt dafür sogenannte Restriktionsendonukleasen, auch Restriktionsenzyme genannt, die zum überwiegenden Teil aus Bakterien stammen. Bakterien benutzen diese Enzyme, um fremde unmethylierte DNA, die durch einen Vektor in ihre methylierte DNA integriert worden ist, zu erkennen und zu entfernen. Die Enzyme erkennen überwiegend palindrome Sequenzen, meist bestehend aus einer Länge von 4 bis 8 Basen, binden und schneiden die DNA an bestimmten Stellen. Die Erkennungsstellen sind nicht zwangsläufig auch die Schnittstellen. Es entstehen anschließend DNA-Fragmente, die man mittels einer Gelelektrophorese sichtbar machen kann. Zunutze macht man sich diese Eigenschaften, indem man zur Genotypisierung gezielt nach einer Restriktionsendonuklease sucht, die nur die zu überprüfende Variante oder nur den Wildtyp schneidet (Berg Rasmussen 2012).

2.8.1.1 Durchführung der RFLPs bei *TUFM* für die Varianten rs61737565 und rs4788099

Mithilfe des Programms „NEBcutter V2.0“ der Firma New England Biolabs (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, Vincze et al. 2003) wurden geeignete Enzyme zur RFLP für die zu untersuchenden Proben bestimmt. Hierzu wurde die Sequenz eines Wildtyps von *TUFM* gegen die Sequenz einer Mutation von *TUFM* verglichen und gezielt nach Restriktionsenzymen gesucht, die nur den Wildtyp oder nur die Variante schneiden. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die entstehenden Fragmente eine ausreichende Länge haben, um die bei einer Gelelektrophorese entstehenden Banden deutlich voneinander unterscheiden zu können. Eine Übersicht über alle verwendeten Enzyme während der Laborarbeiten liefert Tabelle 2.10. Im

Rahmen dieser Arbeit wird im Folgenden nur auf die Enzyme und Bedingungen der Fragmente 3,4,5 und 6 eingegangen, für die Fragmente 1,2 und 7 möchte ich auf die Arbeit von Frau Touma verweisen (Touma 2016).

Zur Durchführung der RFLPs wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Dieser erhielt 12µl PCR-Produkt (für die genauen PCR-Bedingungen siehe Tabelle 2.12), Puffer gemäß den Herstellerangaben, das entsprechende Enzym in Units (*Cac8I* = 4 Units, *PfI*FI = 1 Unit), Bovines Serum Albumin (BSA) gemäß den Herstellerangaben zur Stabilisierung der Reaktion (nur beim Enzym *PfI*FI) und wurde mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 18µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte der Verdau über Nacht im Wasserbad bei 37°C. Am nächsten Morgen wurden die Fragmente auf eine Gelelektrophorese aufgetragen, der Größe nach getrennt und konnten gegen bekannte Wildtyp- oder Mutanten-DNA verglichen werden. Für die genauen Restriktionsbedingungen der Enzyme siehe Tabelle 2.19, eine Übersicht über die Schnittstellen sowie die Fragmentlängen findet sich in Tabelle 2.20.

Tabelle 2.19 Restriktions- und Auftragsbedingungen der verwendeten Enzyme zur RFLP

| Enzym | Puffer | Restriktionsbedingungen | Agarosegel |
|---------------|----------------------------|--|---------------|
| <i>Cac8I</i> | NEBuffer 4 | <u>Inkubieren:</u> bei 37°C über Nacht <u>Deaktivieren:</u> bei 65°C für 20 Minuten | 3,0 %iges Gel |
| <i>PfI</i> FI | NEBuffer 4 + 100 µg/ml BSA | <u>Inkubieren:</u> bei 37°C über Nacht <u>Deaktivieren:</u> bei 65°C für 20 Minuten | 2,5 %iges Gel |

Tabelle 2.20 Verwendete Enzyme zur RFLP mit Schnittstellen (rot markiert) und den resultierenden Fragmentlängen in Basenpaaren (Bp) des Wildtyps und der Variante (ein weiteres Fragment mit einer Länge von 52 bp bei der Variante rs61737565 durch das Enzym *Cac8I* ist nicht berücksichtigt, da dieses Fragment nur schwer sicher und reliabel mittels Gelelektrophorese zu erkennen gewesen wäre).

| SNP | Enzym u. Schnittstelle | Fragmentlängen des Wildtyps | Fragmentlängen der Variante |
|------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| rs61737565 | <i>Cac8I</i> 5'... GCN NGC ... 3' 3'... CGN NCG ... 5' | 331 bp und 156 bp | 279 bp und 156 bp |
| rs4788099 | <i>PfI</i> FI 5'... GACN NNGTC... 3' 3'... CTGNN NCAG... 5' | 263 bp und 224 bp | 487 bp |

2.8.2 Tetra-primer ARMS-PCR

Die Tetra-primer ARMS-PCR (= *Amplification refractory mutation system-PCR*, *ARMS-PCR*, auch *Allelspezifische PCR*) ist ein Verfahren, um PCR-basiert den Austausch einer Base nachzuweisen. Ähnlich dem Prinzip der RFLP folgend, erhält man bei diesem Verfahren DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die sich per Gelelektrophorese auftrennen lassen. Der Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass man jedoch kein zusätzliches Enzym bzw. einen Verdau braucht, um SNPs zu detektieren.

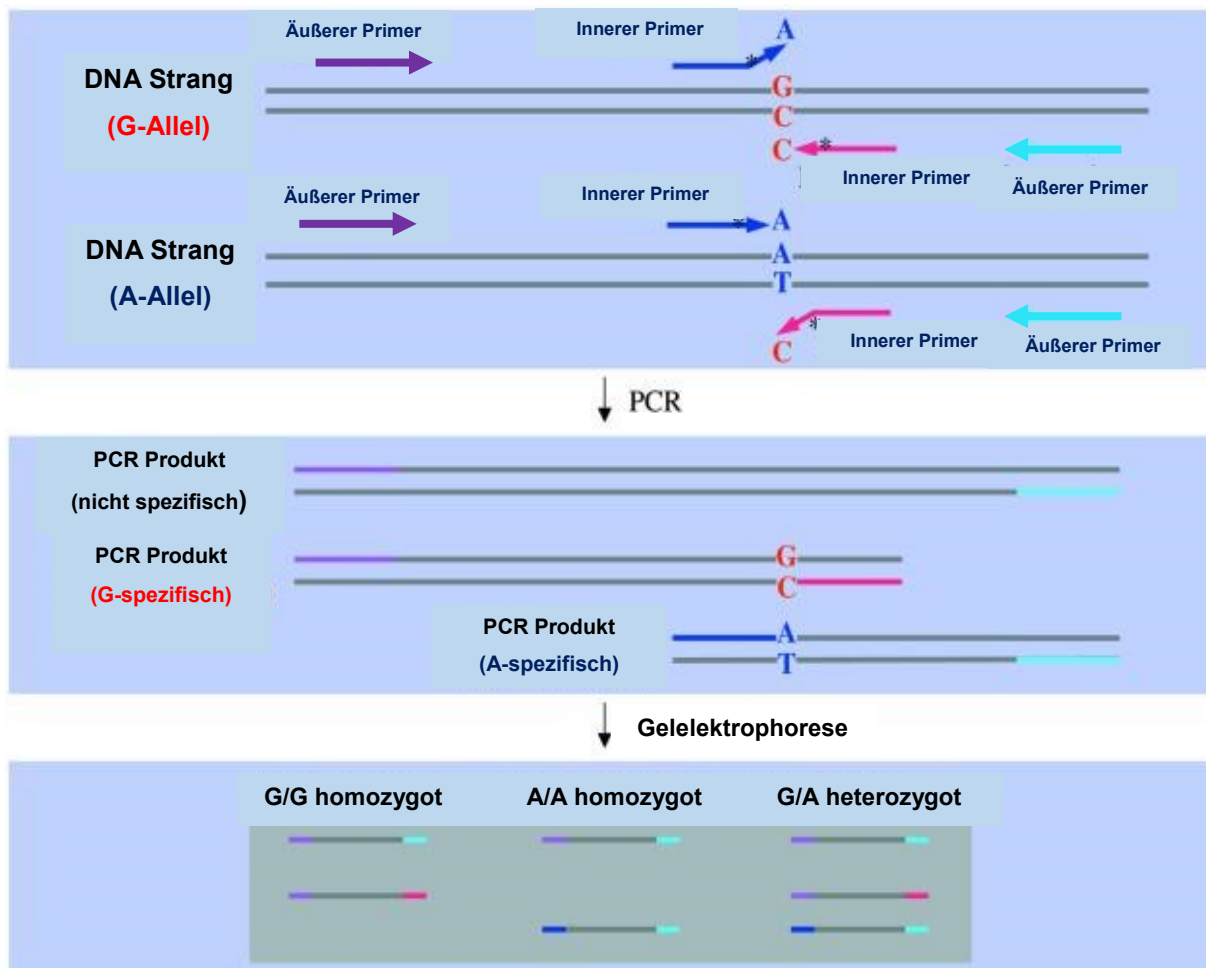


Abbildung 2.3 Theoretischer Ablauf einer ARMS-PCR. Es liegen 2 Allele vor, die durch die spezifischen inneren Primer (blau, pink) unterschieden werden sollen. Die äußeren Primer (violett, türkis) legen die Länge der Fragmente fest. Nach Durchführung einer PCR erhält man ein spezifisches Bandenmuster (unterer Kasten), aus dem man erkennt, welche Allele in dem Reagenz vorhanden waren (Abbildung entnommen und mit deutschen Beschriftungen versehen aus Ye et al. 2001, ©2001 Oxford University Press, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt).

Man benötigt für dieses Verfahren insgesamt 4 Primer, darunter 2 äußere Primer (Outer-Primer), die allelunabhängig binden und 2 innere Primer (Inner-Primer), die spezifisch für den Wildtyp oder den SNP der Mutante sind (Ye et al. 2001). Die Inner-Primer binden allelspezifisch und unterscheiden sich in ihrem 3'-Ende. Die Funktion der beiden Outer-Primer ist es, sicherzustellen, dass der gesuchte Genotyp vorhanden ist. Zudem legen sie die Länge der Fragmente fest, so dass man bei der anschließenden Gelelektrophorese die resultierenden Produkte besser voneinander unterscheiden kann. Zur zusätzlichen Allelspezifität wurde, ausgehend vom 3'-Ende der Inner-Primer, an der Position -2 ein absichtlicher Basen-Mismatch eingebaut, um zu verhindern, dass die Inner-Primer unspezifisch binden und somit ein unspezifisches Fragment synthetisieren (siehe Tabelle 2.22 die blaumarkierten Basen). Welcher Mismatch hierfür favorisiert wird, hängt von der Base des zu detektierenden SNPs ab (Ye et al. 2001).

Wie in Abbildung 2.3 zu sehen ist, kommt es bei entsprechender Oligonukleotidhybridisierung allelspezifisch zur Synthese verschieden langer DNA-Stränge, die sich anschließend per Gelelektrophorese auftrennen lassen. Man erhält ein Bandenmuster, das für einen bestimmten Genotyp charakteristisch ist. Das Ablesen dieses Musters ermöglicht eine Aussage über das Vorhandensein der Wildtyp- oder Mutanten-Allele.

2.8.2.1 Durchführung der Tetra-ARMS-PCR bei *TUFM* Exon 3 für die Variante rs8061877

Die Genotypisierung in Exon 3 wurde mittels ARMS-PCR durchgeführt. Die Auswahl geeigneter ARMS-PCR-Primer erfolgte mittels des Programmes „Batch Primer 3“ (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>, You et al. 2008). Das Programm errechnete zudem theoretische Annealing-Temperaturen der Primer, die als erster Maßstab bei der Etablierung dienten. Gleichzeitig erlaubt das Programm eine Aussage über zu erwartende Sekundärstrukturen, die jeder Primer aufgrund seiner Basenabfolge mit sich selbst bildet. Es wurde darauf geachtet, dass die Wahrscheinlichkeit der Primer, dieses Phänomen zu zeigen, möglichst gering ist. Letztendlich erfolgte die Etablierung der PCR in einem Gradienten-Cycler mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen und bei verschiedenen Annealing-Temperaturen, bis ideale Reaktionsbedingungen herrschten (siehe hierzu auch den Abschnitt „Optimierung einer PCR“ auf Seite 33). Die Genotypisierung der Variante in Exon 3 (rs8061877 C>T) gelang problemlos. Für die genauen Reaktionsbedingungen der ARMS-PCR siehe Tabelle 2.21. Es wurde eine Konzentration von 2,0 mM $MgCl_2$ gewählt und die Inner-Primer im Verhältnis 1:6 verdünnt, um ideale Bandenmuster zu erhalten. Die verwendeten ARMS-PCR-Primer und ihre Länge zeigt Tabelle 2.22.

Tabelle 2.21 Reaktionsbedingungen der ARMS-PCR für *TUFM* Exon 3 Variante rs8061877

| Schritt | Zyklen | Dauer | Temperatur |
|------------------------|-----------|-------------|------------|
| initiale Denaturierung | 1 Zyklus | 5 Minuten | 95°C |
| Denaturierung | 30 Zyklen | 30 Sekunden | 95°C |
| Annealing | | 30 Sekunden | 61°C |
| Elongation | | 30 Sekunden | 72°C |
| finale Elongation | 1 Zyklus | 10 Minuten | 72°C |
| Kühlung | | ∞ | 4°C |

Tabelle 2.22 Verwendete ARMS-PCR-Primer für Fragment 3 (rs8061877 C>T) und Länge der Primer (i = inner-Primer, o = outer-Primer, F = Forward, R = Reverse). Die Basen-Mismatches zur Erhöhung der Allelspezifität sind blau gekennzeichnet. Gen-Sequenz und Startpositionen der einzelnen Primer in *TUFM* nach hg19, NCBI 37 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/>).

| Primer | Sequenz | Länge | Startposition |
|--------------|------------------------------------|-------|---------------|
| rs8061877 oF | 5'-ACAGTTCTCTCTGCTGGAAGAGTTAGAG-3' | 28 bp | 315 |
| rs8061877 oR | 5'-CTCACCTTAACATAATCTGCATGACC-3' | 26 bp | 620 |
| rs8061877 iF | 5'-CACTGGAACCTTTAGCTGAGAGGTTG-3' | 26 bp | 406 |
| rs8061877 iR | 5'-TCAGCTAGAACTAAAGGAGGAAAAGCAT-3' | 28 bp | 460 |

2.9 Statistische Auswertung

2.9.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben der englische Mathematiker G. H. Hardy und der deutsche Arzt W. Weinberg unabhängig voneinander eine Methode der Populationsgenetik, um Allelhäufigkeiten in einer idealen Population berechnen zu können (Hardy 1908; Weinberg 1908). Um ihren Ansatz verwenden zu können, muss eine betrachtete Population mit den darin enthaltenen Organismen folgende, unter Normalbedingungen der Evolution allerdings kaum zu erfüllende, Voraussetzungen haben (Bosco et al. 2012; Hartl und Clarke 2007):

- der Organismus ist diploid
- der Organismus pflanzt sich geschlechtlich fort
- die verschiedenen Generationen des Organismus' überlappen sich innerhalb der Population nicht
- die geschlechtliche Fortpflanzung ist zufallsbedingt und alle Allele werden gleichstark vererbt (Panmixie)
- die Population ist von signifikanter Größe, so dass das Ausscheiden eines Organismus'/Allels keinen Einfluss auf die Genotypen der Gesamtpopulation hat

- die Allelfrequenzen sind unter den verschiedenen Geschlechtern, die sich fortpflanzen, gleichermaßen verteilt
- es findet innerhalb der Population keine Migration, Mutation oder Selektion der Organismen statt

Nehmen wir nun an, dass die Elterngeneration der Population am zu betrachtenden Genort zwei Allele hat, A und a, und diese mit den Häufigkeiten p bzw. q vorliegen, so gilt: $p + q = 1$. Mithilfe einer Kreuztabelle lässt sich schließlich die Verteilung der Allele in der Folgegeneration darstellen:

| | A (p) | a (q) |
|-------|--------------|--------------|
| A (p) | AA (p^2) | Aa (pq) |
| a (q) | Aa (pq) | aa (q^2) |

Wie man ferner erkennen kann, bleibt diese Verteilung der Allele unter der Voraussetzung einer idealen Population (siehe oben) über Generationen hinweg immer gleich. Die Population befindet sich somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Rotach 2001). Berechnen lässt sich das Auftreten der einzelnen Genotypen der Folgegenerationen gemäß des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit der aus der Kreuztabelle folgenden Formel:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

2.9.2 Annahmen und Statistische Tests

Vor Beginn der experimentellen Untersuchung von *TUFM* wurden Hypothesen formuliert, die nach Abschluss der Laborarbeiten mittels statistischer Tests überprüft wurden. Im Vorfeld standen folgende Überlegungen (Gajjar 2013; Lowry 2015; Wandolski 2010):

1. Formulierung der Null-Hypothese (H_0)

Der untersuchte Bereich von *TUFM* weist **keine** Varianten auf, die bei der im Rahmen der Arbeit festgelegten Gruppe von extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (= Phänotyp P1) im Vergleich zur Normalpopulation (= Phänotyp P2) in signifikant anderer Zahl vorkommen und damit ggf. einen Zusammenhang mit der Ausprägung des Übergewichts vermuten lassen. Die mittleren Allelfrequenzen zeigen somit **keinen** signifikanten Unterschied im Vergleich zur Normalpopulation (Gajjar 2013; Lowry 2015).

Es gilt somit die Beziehung $H_0: P1 = P2$

2. Formulierung der Alternativ-Hypothese (H_1)

Der untersuchte Bereich von *TUFM* weist Varianten auf, die bei der im Rahmen der Arbeit festgelegten Gruppe von extrem adipösen Kindern und Jugendlichen (= Phänotyp P1) im Vergleich zur Normalpopulation (= Phänotyp P2) in signifikant anderer Zahl vorkommen und damit ggf. einen Zusammenhang mit der Ausprägung des Übergewichts vermuten lassen. Die mittleren Allelfrequenzen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Normalpopulation.

Die Formulierung der Alternativ-Hypothese erfolgt einseitig, da nur der Zusammenhang zu Übergewicht betrachtet wird (Gajjar 2013; Lowry 2015).

Es gilt somit die Beziehung $H_1: P1 \neq P2 \rightarrow H_1: P1 > P2$

3. Wahl des Signifikanzniveaus

Es wurde festgelegt, die Null-Hypothese erst zu verwerfen, wenn der Wert für die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner oder gleich 5% beträgt. Andernfalls besteht die Gefahr, die Null-Hypothese abzulehnen, obwohl sie eigentlich richtig ist. Das Signifikanzniveau liegt somit bei $p = 5\%$ bzw. $p = 0,05$ (Gajjar 2013; Lowry 2015).

4. Testverfahren zur Überprüfung der Hypothesen und zur Berechnung des Signifikanzniveaus

Die Berechnung erfolgte mit dem Fisher's Exact Test (Fisher 1922), um auch kleine Stichproben aussagekräftig berechnen zu können.

5. Durchführung des Tests und anschließende Entscheidung über die Hypothesen

Am Ende der Berechnungen lässt sich anhand des ermittelten p -Wertes gefundener SNPs eine Aussage über den Einfluss von *TUFM* auf die phänotypische Ausprägung des Übergewichts machen. Die Null-Hypothese wird entweder angenommen oder verworfen (bei $p \leq 0,05$) (Gajjar 2013; Lowry 2015).

2.9.2.1 Der exakte Test nach Fisher (Fisher's Exact Test)

Der von Ronald Aylmer Fisher 1922 entwickelte Test zur Überprüfung von statistischen Hypothesen basiert auf einer Kontingenztafel (Fisher 1922). War er ursprünglich für eine 2*2-große Kontingenztafel entwickelt worden, gilt er mittlerweile auch für $m \times n$ -große Kontingenztafeln (Mehta und Patel 1983). Er ermöglicht eine Berechnung des p -Wertes auch für kleinere Gruppengrößen n und liefert valide Ergebnisse.

Ausgehend von z.B. einer 2*2-großen Kontingenztafel mit ihren Variablen a, b, c, d ergibt sich die Wahrscheinlichkeit p aller Randsummen in allen kombinierbaren Möglichkeiten als Summe von Gliedern einer sog. hypergeometrischen Verteilung (Lowry 2015):

$$\frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{n! a! b! c! d!} = p$$

Mithilfe einer auf dieser Formel basierenden Software wurden die p -Werte für jeden zu testenden SNP bei *TUFM* selbstständig errechnet. Benutzt wurde für die Berechnung der genotypischen p -Werte die Software (Lowry 2015) „Fisher Exact Probability Test: 2x3“ (<http://vassars-tats.net/fisher2x3.html>), sowie zur unabhängigen Kontrolle der p -Werte die Software (Uitenbroek 1997) „SISA-Binomial“ (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>).

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsscreening

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden die kodierenden exonischen Bereiche des *TUFM*-Gens auf das Vorliegen von Mutationen geprüft. Zusätzlich wurde in 5'-Richtung 221bp vor dem Startcodon und 245bp nach dem Stopp-Codon gescreent. Der gesamte gescreente Bereich von *TUFM* umfasst, inklusive der nur zum Teil betrachteten intronischen Bereiche (genaue Platzierung der Primer und untersuchter Bereich im Gen siehe Anhang 7.1), insgesamt 3761bp. Die Aufteilung dieses Bereiches erfolgte in sieben Fragmente mit definierter Länge (siehe Tabelle 2.13). Das laborexperimentelle Mutationsscreening und die sich anschließende Genotypisierung fanden von Dezember 2011 bis Juni 2012 in Zusammenarbeit mit Frau Touma statt. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Ergebnisse der Fragmente 3,4,5 und 6 (entsprechend den Exons 3 bis 9) eingegangen, die genauen Ergebnisse der Fragmente 1,2 und 7 (entsprechend den Exons 1,2 und 10) finden sich in der Promotionsarbeit (Titel: Molekulargenetische Analyse am TUFM-Gen [Tu translation elongation factor mitochondrial gene] bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen) von Frau Touma. Zum besseren Verständnis wird

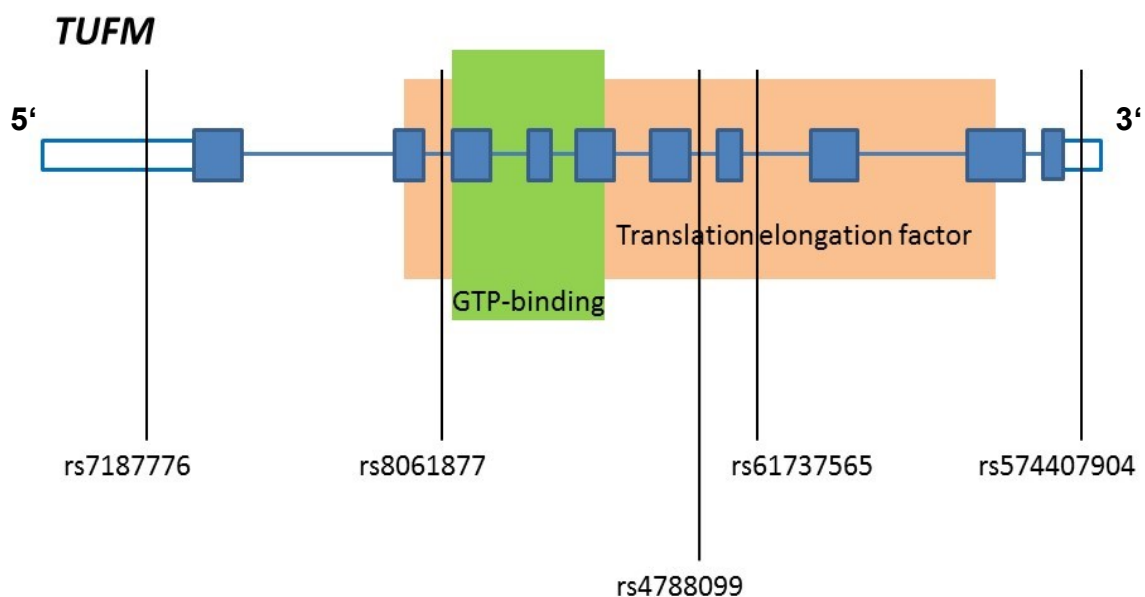


Abbildung 3.1 Übersicht über alle in dieser Arbeit detektierten SNPs und ihre Position in *TUFM* (vertikale schwarze Linien). Exons sind durch blaue Kästen dargestellt, Introns durch die horizontal verlaufende blaue Linie. Nicht kodierende exonische Bereiche vor dem Start- bzw. nach dem Stopp-Codon sind durch nicht ausgefüllte Kästen dargestellt. Funktionell wichtige Bereiche sind farblich hervorgehoben (entnommen und modifiziert aus Volckmar et al. 2015 nach dem online-verfügbarem Anhang „S3 Fig. Mutated positions in the obesity candidate genes of chr16p11.2 and regional overview“, © 2015 Volckmar, Struve et al.).

an einigen Stellen dieser Arbeit kurz auf die Ergebnisse von Frau Touma eingegangen (Touma 2016).

Das Mutationsscreening von *TUFM* erfolgte an 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen. Beim Auffinden einer möglichen Variante mittels eines Screening-Verfahrens wurde dieser auffällige Befund über ein zweites Verfahren unabhängig bestätigt. Es wurden insgesamt 5 SNPs gefunden, von denen bei Durchführung des Screenings 4 bereits mittels rs-Nummer bekannt waren. Bei diesen handelt es sich um die SNPs rs7187776 T>C (Exon 1), den wir in unserem Kollektiv insgesamt 9 x fanden, rs8061877 C>T (Exon 3), den wir in unserem Kollektiv insgesamt 4 x fanden, rs61737565 G>C (Exon 7), den wir in unserem Kollektiv insgesamt 7 x fanden, und rs4788099 A>G (Exon 7), den wir in unserem Kollektiv insgesamt 8 x fanden. Ein zum Zeitpunkt unseres Screenings (im März 2012) unbekannter SNP, den wir in unserem Kollektiv einmal fanden, ist mittlerweile ebenfalls katalogisiert und lässt sich nun mittels rs-Nummer (rs574407904 C>G) auffinden. Zur Durchführung der Mutationssuche wurde für die Exons 2 und 3 das SSCP-Verfahren verwendet, die übrigen Exons wurden teilweise zu Fragmenten zusammengelegt und mittels dHPLC gescreent. Die Bestätigung gefundener Varianten erfolgte bei den Exons 1,6 und 7 mittels RFLP, bei den Exons 3 und 10 mittels ARMS-PCR. Die Exons 2,4,5,8 und 9 wiesen keine Abweichungen auf, wir fanden beim Screening in unserem Kollektiv keine Varianten. Eine genaue Übersicht über die Exons, die Fragmente, die gefundenen SNPs, die Häufigkeiten der Allele, die mittleren Allelfrequenzen und die verwendete Screening-Methode liefert Tabelle 3.1. Eine grafische Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeiten detektierten SNPs liefert Abbildung 3.1. Eine Darstellung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für die gefundenen SNPs in *TUFM* findet sich in Tabelle 3.2.

Tabelle 3.1 Detektierte und in dieser Arbeit betrachtete SNPs in *TUFM* (mit Angabe des Exons, des Fragments, der rs-Nummer, der absoluten und prozentualen Häufigkeiten der Allele, der mittleren Allelfrequenz (MAF) absolut sowie prozentual, und der zur Detektion genutzten laborexperimentellen Methode; insgesamt wurden 95 Individuen genotypisiert).

| Fragment | SNP | Häufigkeiten | | mittlere Allelfrequenz | | Methode |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------|
| | | absolut | prozentual | absolut | prozentual | |
| Exon 3 (\triangleq Frg. 3) | rs8061877 (C>T) | CC = 92x CT = 2x TT = 1x | CC = 96,8% CT = 2,2% TT = 1% | C = 0,979 T = 0,021 | C = 97,9% T = 2,1% | SSCP/ dHPLC |
| Exon 6 + 7 (\triangleq Frg. 5) | rs61737565 (G>C) | GG = 90x GC = 3x CC = 2x | GG = 94,7% GC = 3,2% CC = 2,1% | G = 0,963 C = 0,037 | G = 96,3% C = 3,7% | dHPLC |
| | rs4788099 (A>G) | AA = 89x AG = 3x GG = 3x | AA = 93,6% AG = 3,2% GG = 3,2% | A = 0,953 G = 0,047 | A = 95,3% G = 4,7% | dHPLC |

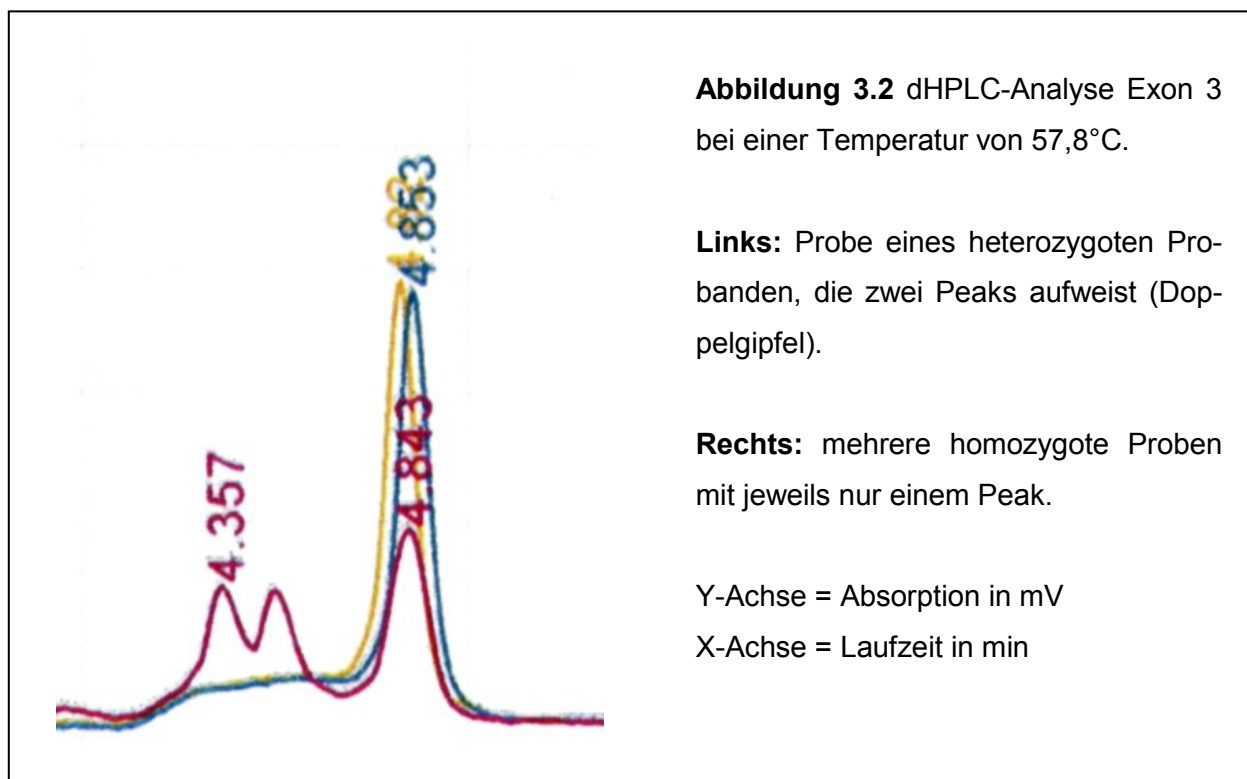
Tabelle 3.2 Darstellung der absoluten und prozentualen Häufigkeiten der im Screening von *TUFM* detektierten SNPs mit Angabe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (insgesamt wurden 95 Individuen genotypisiert; die Berechnungen erfolgten zuerst selbst und wurden anschließend mit der Software „Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 2 Alleles“ überprüft [<http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>]).

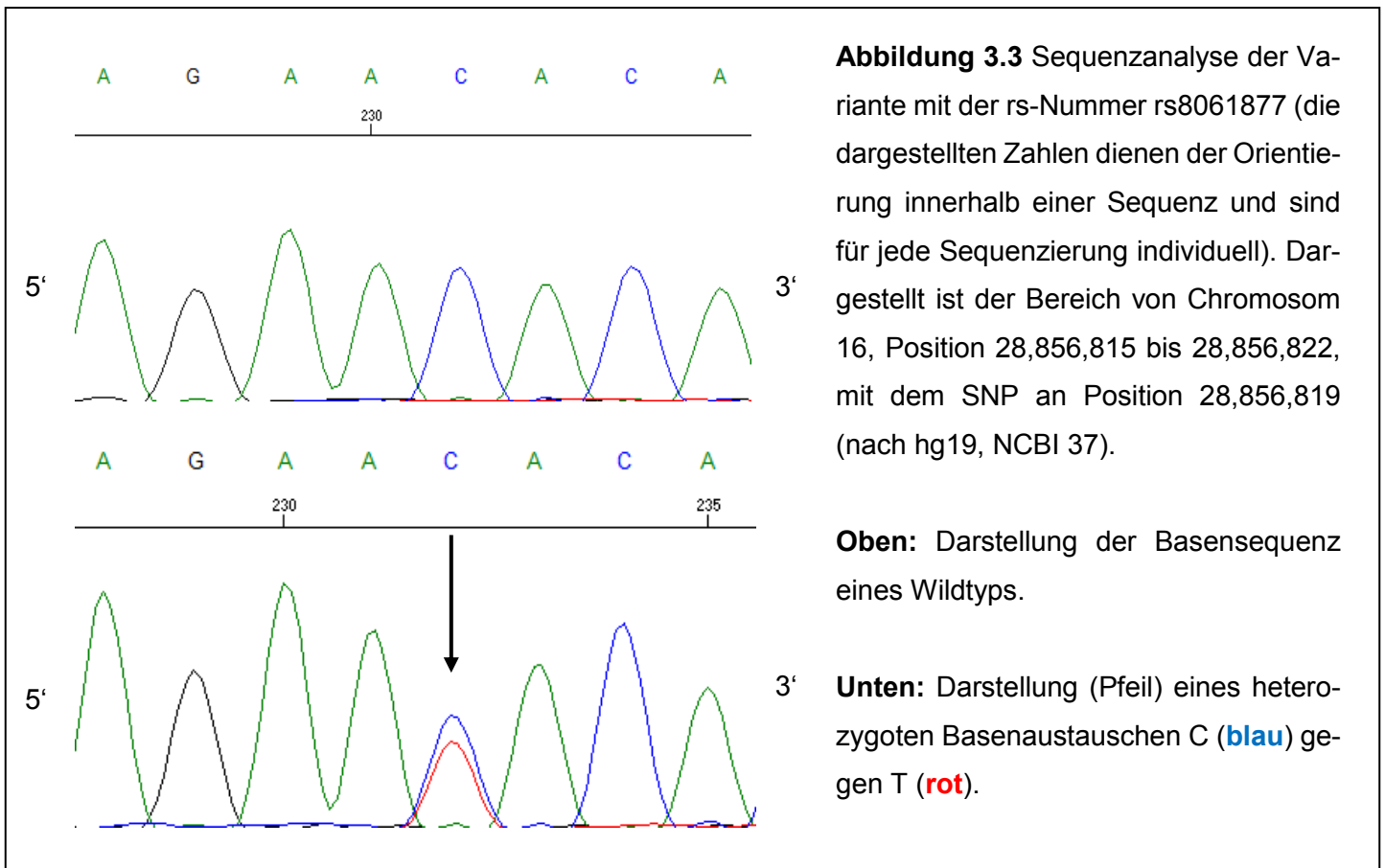
| SNP | Häufigkeiten | | Hardy-Weinberg-Gleichgewicht | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | absolut | prozentual | erwartet | prozentual |
| rs8061877 (C>T) | CC = 92x CT = 2x TT = 1x | CC = 96,8% CT = 2,2% TT = 1% | CC = 91x CT = 3,92x TT = 0,04x | CC = 95,8% CT = 4,1% TT = 0,04% |
| rs61737565 (G>C) | GG = 90x GC = 3x CC = 2x | GG = 94,7% GC = 3,2% CC = 2,1% | GG = 88,13x GC = 6,74x CC = 0,13x | GG = 92,8% GC = 7,1% CC = 0,14% |
| rs4788099 (A>G) | AA = 89x AG = 3x GG = 3x | AA = 93,6% AG = 3,2% GG = 3,2% | AA = 86,21x AG = 8,57x GG = 0,21x | AA = 90,8% AG = 9% GG = 0,22% |

3.1.1 Sequenzvarianten in Exon 3

3.1.1.1 Introniche Variante rs8061877 (C>T) in *TUFM*

Das Mutationsscreening in Exon 3 sollte mittels SSCP durchgeführt werden. Um eine ideale Fragmentlänge für diese Methode zu erreichen, wurde Exon 3 vor der SSCP mittels eines Enzyms geschnitten (Bedingungen siehe Tabelle 2.15 und Tabelle 2.17). Da sich nach dem





Schneiden und Durchführung des Verfahrens jedoch nach einigen Versuchen keine zufriedenstellenden Bandenmuster ergaben, musste die weitere Suche mittels dHPLC fortgeführt werden (siehe Abbildung 3.2). Zu den Reaktionsbedingungen der dHPLC siehe Tabelle 2.18. Um diesen Peak, der bei mehreren Probanden auffiel, genauer abklären zu können, wurden die entsprechenden Proben kommerziell sequenziert und *in silico* analysiert. Es fiel eine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz auf, die bereits mit der rs-Nummer rs8061877 beschrieben worden war; es handelt sich um den Basenaustausch Cytosin zu Thymidin (siehe Abbildung 3.3). Da dieser SNP im Intron liegt, ergibt sich keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

3.1.2 Sequenzvarianten in den Exons 6 und 7

Vor der Detektion möglicher Sequenzvarianten musste zuerst ein um zwei bp veränderter Forward-Primer für Fragment 5 (bestehend aus Exon 6 und 7) bestellt werden, da es trotz der sorgfältigen Auswahl der Primer zuerst nicht möglich war, Fragment 5 per PCR zu vervielfältigen. Nach Analyse der Sekundärstrukturen, die Forward- und Reverse-Primer für Fragment 5 untereinander bildeten, bestellten wir einen um zwei bp verschobenen Forward-Primer und konnten anschließend Fragment 5 problemlos synthetisieren. Eine Übersicht über die verwendeten Primer von *TUFM*, darunter auch die Sequenz der beiden Forward-Primer von Fragment 5, findet sich im Anhang (Abschnitt 7.1 „Verwendete Sequenz von *TUFM* und Primerpositionen“ auf S.91).

3.1.2.1 Intronsche Variante rs61737565 (G>C) in *TUFM*

Das Mutationsscreening in Exon 6 und 7 wurde ausschließlich mittels dHPLC durchgeführt. Zu den Reaktionsbedingungen der dHPLC siehe Tabelle 2.18.

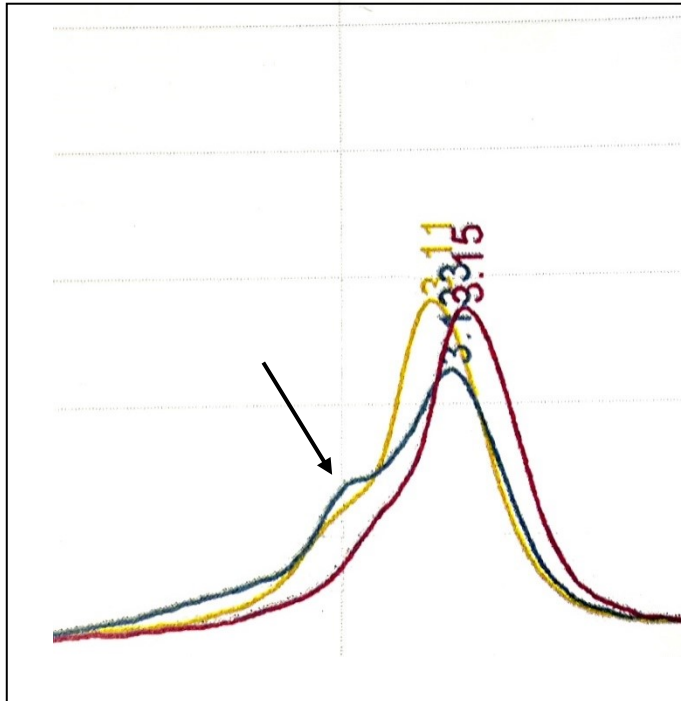


Abbildung 3.4 dHPLC-Analyse Exon 7 bei einer Temperatur von 61,0°C.

Es finden sich 2 homozygote Proben mit jeweils einem Peak und 1 heterozygote Probe, die charakteristisch eine „Schulter“ auf dem Peak aufweist (Pfeil).

Y-Achse = Absorption in mV

X-Achse = Laufzeit in min

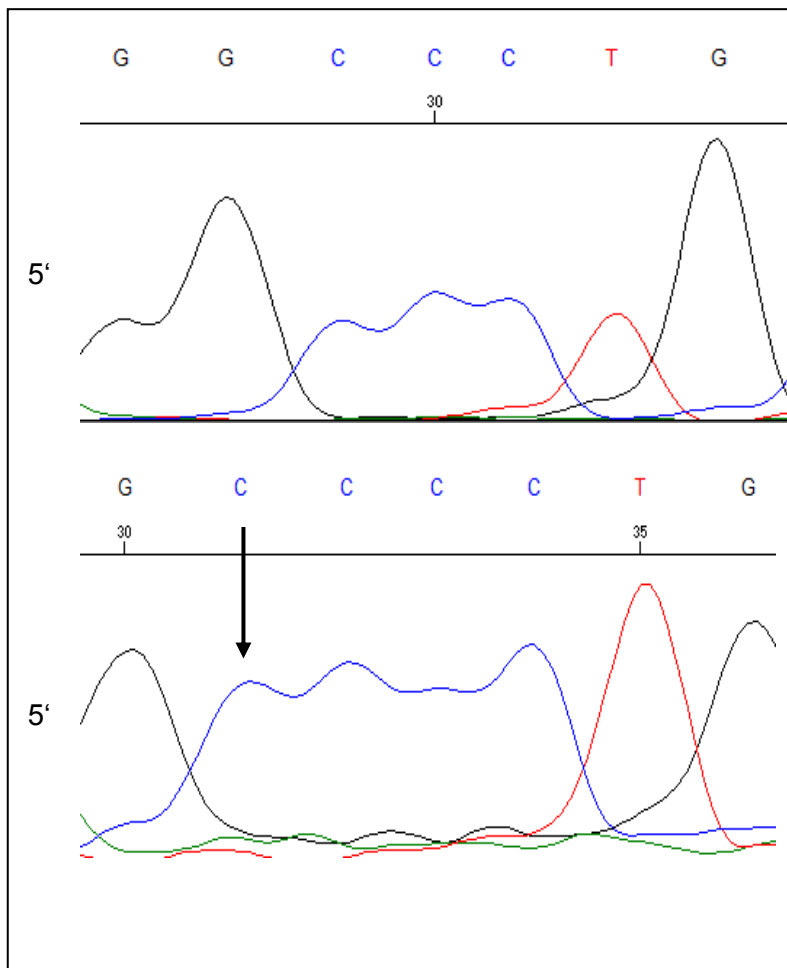


Abbildung 3.5 Sequenzanalyse der Variante mit der rs-Nummer rs61737565 (die dargestellten Zahlen dienen der Orientierung innerhalb einer Sequenz und sind für jede Sequenzierung individuell). Dargestellt ist der Bereich von Chromosom 16, Position 28,855,521 bis 28,855,527, mit dem SNP an Position 28,855,522 (nach hg19, NCBI 37).

Oben: Darstellung der Basensequenz eines Wildtyps. Zu erkennen sind insgesamt 3x die Base C.

Unten: Darstellung (Pfeil) eines homozygoten Basenaustausches G (**schwarz**) gegen C (**blau**). Durch den Austausch findet sich 4x die Base C.

Wie bereits beim Screening von Exon 3 wurde auch dieser Peak (siehe Abbildung 3.4), der bei mehreren Probanden auffiel, genauer abgeklärt, indem die entsprechenden Proben kommerziell sequenziert und *in silico* analysiert wurden. Es fiel eine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz auf, die bereits in der Literatur beschrieben worden war. Sie trägt die rs-Nummer rs61737565 und verursacht einen Basenaustausch von Guanin zu Cytosin (siehe Abbildung 3.5). Da dieser SNP im Intron liegt, ergibt sich keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

3.1.2.2 Intronsche Variante rs4788099 (A>G) in *TUFM*

Diese Variante wurde ebenfalls zuerst mittels dHPLC als Screening-Methode entdeckt. Zu den Reaktionsbedingungen der dHPLC siehe Tabelle 2.18. Auch dieser Peak, der bei mehreren Probanden auffiel, wurde durch Sequenzierung der entsprechenden Proben genauer abgeklärt (siehe Abbildung 3.6). Alle homozygoten Varianten wiesen in dieser Versuchsreihe als alleiniges Differenzierungsmerkmal gegenüber dem Wildtyp einen höheren Peak auf. Die dabei auffallende Abweichung von der Wildtyp-Sequenz war ebenfalls in der Literatur bekannt und trägt die rs-Nummer rs4788099. Sie verursacht einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin (siehe Abbildung 3.7). Da dieser SNP im Intron liegt, ergibt sich keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

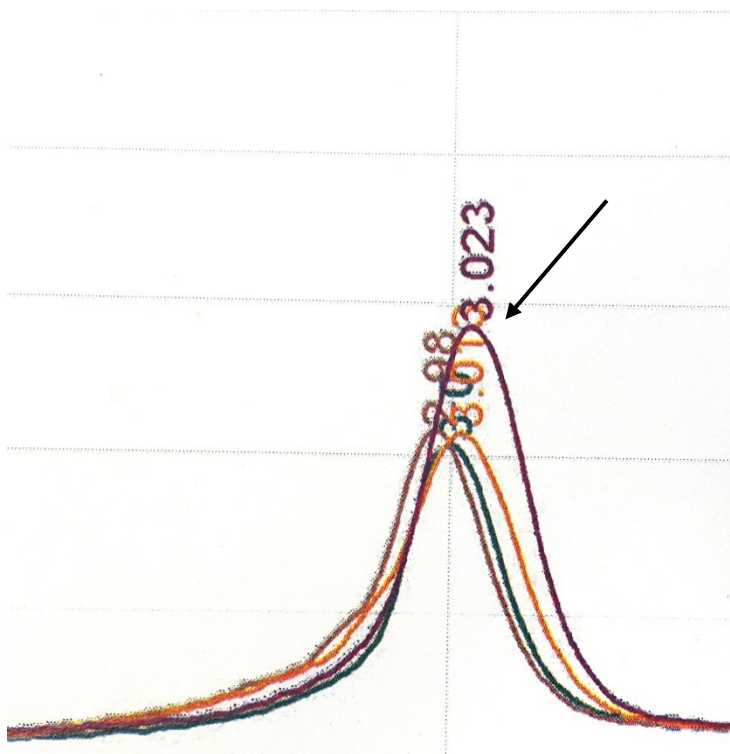


Abbildung 3.6 dHPLC-Analyse Exon 7 bei einer Temperatur von 61,5°C.

Es finden sich 3 homozygote Wildtyp-Proben mit jeweils einem Peak und 1 homozygote Probe (Pfeil), die durch einen höher ausschlagenden Peak gekennzeichnet ist. Alle detektierten homozygoten Varianten wiesen als Differenzierungsmerkmal einen höheren Peak auf.

Y-Achse = Absorption in mV

X-Achse = Laufzeit in min

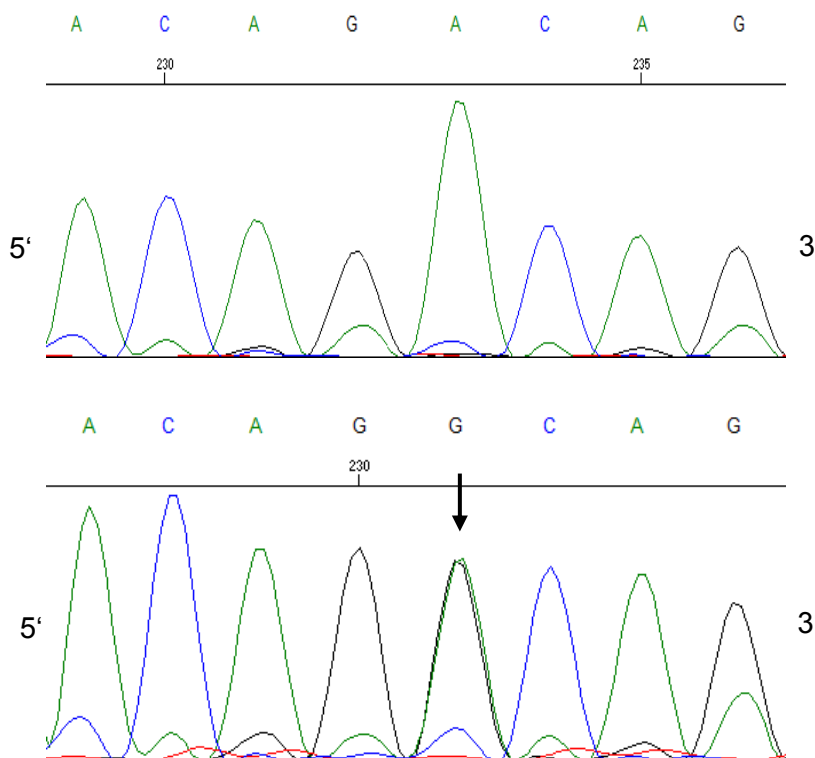


Abbildung 3.7 Sequenzanalyse der Variante mit der rs-Nummer rs4788099. (die dargestellten Zahlen dienen der Orientierung innerhalb einer Sequenz und sind für jede Sequenzierung individuell). Dargestellt ist der Bereich von Chromosom 16, Position 28,855,723 bis 28,855,730, mit dem SNP an Position 28,855,727 (nach hg19, NCBI 37).

Oben: Darstellung der Basensequenz eines Wildtyps.

Unten: Darstellung (Pfeil) eines heterozygoten Basenaustauschen A (**grün**) gegen G (**schwarz**).

3.2 Genotypisierung

Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben erfolgte nach dem Mutationsscreening eine Genotypisierung des untersuchten Kollektivs. Die in dieser Arbeit betrachteten Fragmente wurden mittels ARMS-PCR (Exon 3) und RFLP (Exon 6 und 7) genotypisiert. Anschließend wurden die Allelfrequenzen der gefundenen SNPs berechnet und mit einer normalverteilten Kohorte verglichen (hierzu wurden die frei verfügbaren Populationsdaten der Datenbank „1000 genomes Project“ verwendet, McVean und The 1000 Genomes Project Consortium 2012).

3.2.1 ARMS-PCR für rs8061877 (Exon 3) in *TUFM*

Da für den in Exon 3 gefundenen SNP kein Enzym gefunden wurde, welches mit ausreichend hoher Sensitivität und Spezifität für die Genotypisierung geeignet gewesen wäre, führten wir eine ARMS-PCR durch. Die genauen Bedingungen für die PCR sind in Tabelle 2.21 in Abschnitt 2.8.2.1 zu finden. Nach Auswertung der Gelelektrophoresen zeigte sich, dass in unserem Kollektiv insgesamt 4 Probanden den SNP aufwiesen (siehe Abbildung 3.8, hierauf sind 3 der 4 Probanden unseres Kollektivs zu erkennen).

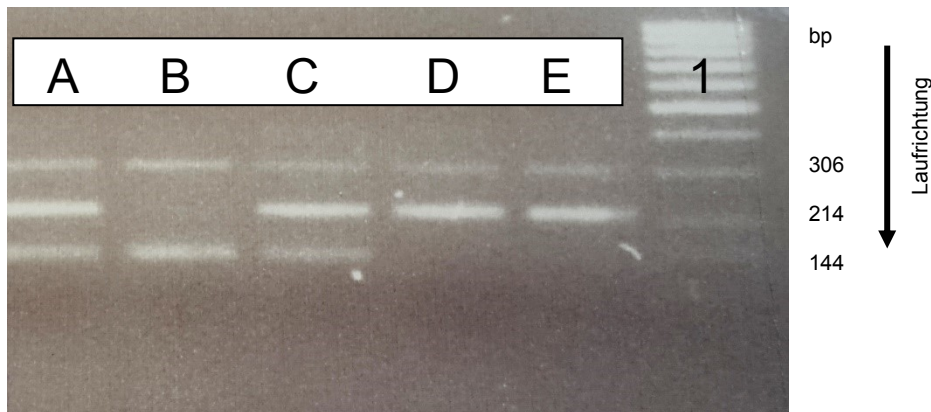


Abbildung 3.8 ARMS-PCR des SNPs rs8061877 (Ausschnitt eines 2,5%-Agarosegels versetzt mit Ethidiumbromid. Banden D und E = Wildtyp; Banden A und C = heterozygote Varianten; Bande B = homozygote Variante. Ein DNA-Längenmarker (1) lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften der ARMS-PCR und ihrer Primer siehe Tabelle 2.22).

3.2.2 RFLP für rs61737565 und rs4788099 (Exon 7) in *TUFM*

Mithilfe des Programms „NEBcutter V2.0“ der Firma New England Biolabs (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, Vincze et al. 2003) war es möglich, passgenaue Enzyme zur Genotypisierung für die beiden SNPs in Exon 7 zu finden. Eine genaue Übersicht über die Schnittstellen sowie die Fragmentlängen beim Wildtyp bzw. der Mutante findet sich in Tabelle 2.20. Die laborexperimentellen Ergebnisse finden sich für das Enzym *Cac8I* in Abbildung 3.9 und für das Enzym *PfiFI* in Abbildung 3.10.

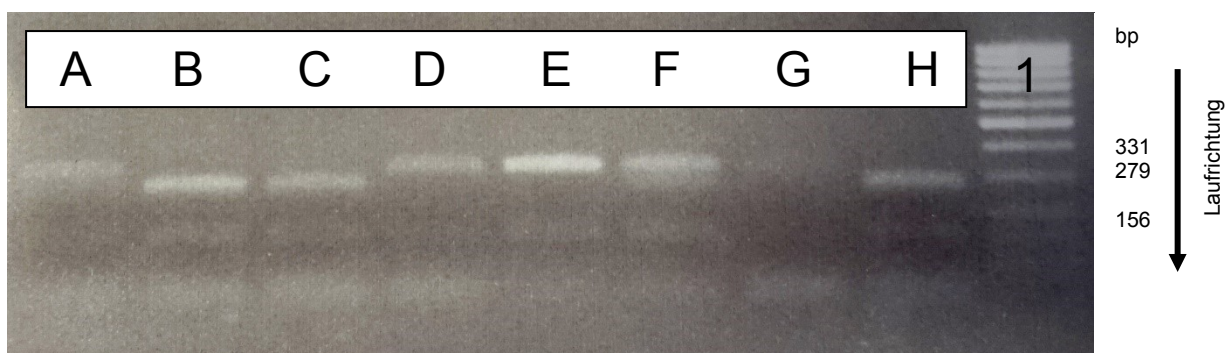


Abbildung 3.9 RFLP-Analyse des SNPs rs61737565 mit dem Enzym *Cac8I* (auf einem 3,0%-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid. Banden D und E = Wildtyp; Banden A und F = heterozygote Varianten; Banden B, C und H = homozygote Varianten. Ein DNA-Längenmarker (1) lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften des Enzyms siehe Tabelle 2.20).

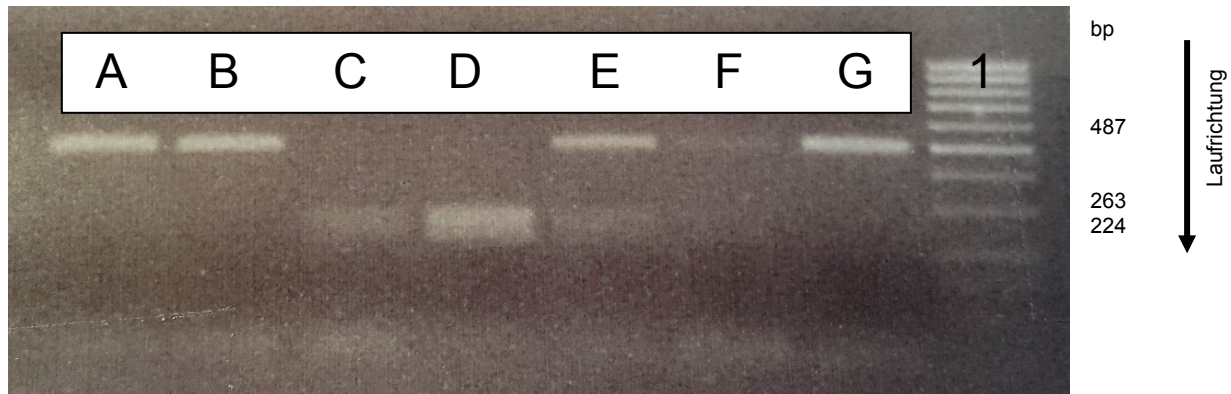


Abbildung 3.10 RFLP-Analyse des SNPs rs4788099 mit dem Enzym *PfiFI* (auf einem 2,5%-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid. Banden C und D = Wildtyp; Banden E und F = heterozygote Varianten; Banden A, B und G = homozygote Varianten. Ein DNA-Längenmarker lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften des Enzyms siehe Tabelle 2.20).

3.2.3 Genotypverteilung und Vergleich der Fall- mit der Kontrollgruppe

Zum Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Fall- mit einer Kontrollgruppe wurden als Kontrollgruppen die frei verfügbaren Populationsdaten der Datenbank „1000 genomes Project“ verwendet (McVean und The 1000 Genomes Project Consortium 2012).

Tabelle 3.3 Darstellung der im Screening von *TUFM* detektierten SNPs (bei insgesamt 95 Individuen) gegenüber der CEU-Population aus dem 1000 genomes Projekt, die in dieser Arbeit als normalverteilte Kontrollgruppe genommen wurde (insgesamt 99 Individuen). Gezeigt sind jeweils die absoluten und prozentualen Häufigkeiten der Allele und ihre mittlere Allelfrequenz (MAF).

| SNP | Häufigkeiten Screening | | MAF Screening | Häufigkeiten CEU | | MAF CEU |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|------------------------|
| | absolut | prozentual | | absolut | prozentual | |
| rs8061877 (C>T) | CC = 92x CT = 2x TT = 1x | CC = 96,8% CT = 2,2% TT = 1% | C = 97,9% T = 2,1% | CC = 55x CT = 35x TT = 9x | CC = 55,6% CT = 35,4% TT = 9% | C = 73,3% T = 26,7% |
| rs61737565 (G>C) | GG = 90x GC = 3x CC = 2x | GG = 94,7% GC = 3,2% CC = 2,1% | G = 96,3% C = 3,7% | GG = 42x GC = 42x CC = 15x | GG = 42,4% GC = 42,4% CC = 15,2% | G = 63,6% C = 36,4% |
| rs4788099 (A>G) | AA = 89x AG = 3x GG = 3x | AA = 93,6% AG = 3,2% GG = 3,2% | A = 95,3% G = 4,7% | AA = 42x AG = 42x GG = 15x | AA = 42,4% AG = 42,4% GG = 15,2% | A = 63,6% G = 36,4% |

Der Vergleich erfolgte mit einer europäisch-stämmigen Normalbevölkerung, bezeichnet als CEU, abgekürzt für „Utah residents with Northern and Western European ancestry“

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=16:28844998-28845998;v=rs8061877;vdb=variation;vf=105983915#1000genomesprojectphase3_table, zuletzt abgerufen am 08.01.2016). Der Datensatz umfasst insgesamt 99 genotypisierte Individuen. Eine Übersicht über die absoluten und prozentualen Genotyp-Häufigkeiten sowie die MAF finden sich in Tabelle 3.3, ebenso die im Rahmen dieser Arbeit laborexperimentell bestimmten Häufigkeiten.

Aufgrund der kleinen Fallzahl der genotypisierten Kohorte, die zudem nicht normalverteilt und nicht repräsentativ war, wurde auf die Angabe eines *p*-Werts verzichtet. Es lässt sich allerdings anhand von Tabelle 3.3 erkennen, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kohorte eine deutlich andere Verteilung der Allele als die Kontrollgruppe aufweist, wobei das Wildtyp-Allel überwiegt.

3.3 *In silico* Analysen

Die in dieser Arbeit gefundenen SNPs liegen ausschließlich im intronischen Bereich. Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz wurden *in silico* Analysen mittels der Software „Mutationtaster 2“ (<http://mutationtaster.org/>, letzter Abruf und Test der SNPs am 09.01.2016) durchgeführt (Schwarz et al. 2014). Die Software gibt eine Vorhersage heraus, in wieweit eine Variante im Genom Einfluss auf Struktur und Funktion des Gens hat. Die Vorhersagen im Rahmen dieser Arbeit finden sich in Tabelle 3.4. Es handelt sich laut „Mutationtaster 2“ bei allen detektierten SNPs um Polymorphismen, die keine funktionelle Relevanz haben.

Weitere *in silico* Analysen mit den Programmen „Panther“ (Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships [<http://www.pantherdb.org/>], Mi et al. 2005; Thomas et al. 2003), „PolyPhen2“ (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; Adzhubei et al. 2010), „SIFT“ (Sorting Intolerant From Tolerant [<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>]; Ng und Henikoff 2001) und „SNAP2“ (<http://rostlab.org/services/snap/>; Hecht et al. 2015) blieben erfolglos, da es sich bei den gefundenen SNPs um nicht-kodierende Varianten handelt, die von diesen Programmen nicht berücksichtigt werden. Regulatorische Effekte ließen sich ebenfalls nicht prüfen.

Tabelle 3.4 SNPs und ihre funktionelle Relevanz nach einer *in silico* Analyse durch das Programm „Mutationtaster 2“ (<http://mutationtaster.org/>)

| SNP | Vorhersage Mutationstaster 2 |
|------------------|------------------------------|
| rs8061877 (C>T) | Polymorphismus |
| rs61737565 (G>C) | Polymorphismus |
| rs4788099 (A>G) | Polymorphismus |

3.4 Nachfolgende Arbeiten

Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden, waren teil eines erweiterten Screenings der chromosomalen Region 16p11.2, die in der Arbeit von Speliotes et al. (2010) und nachfolgend von Locke et al. (2015) mit Adipositas assoziiert ist. Ziel dieses Screenings war es, herauszufinden, welches Gen in dieser Region am ehesten eine Assoziation mit Adipositas bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen aufweist (siehe auch Abschnitt 1.6.6 „GWAS und ihr Beitrag zur Identifikation möglicher Kandidatengene“ auf S.18). Zu diesem Zweck wurde im Vorfeld des Screenings eine Gruppe von 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen definiert, die genotypisiert werden sollte. In dieser Arbeit wurde *TUFM* als genomischer Locus des chromosomalen Bereiches molekulargenetisch untersucht. Weitere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe befassten sich mit den ebenfalls in dieser Region vorkommenden Genen wie dem Src-homologen-2B-Adapter Protein-1 (*SH2B1*), dem Apolipoprotein B48-Rezeptor (*APOB48R*) und der Familie der Sulfotransferasen 1A (*SULT1A1*, *SULT1A2*, *SULT1A3*, Volckmar et al. 2015). Die Ergebnisse des gemeinsamen Screenings finden sich in einer Veröffentlichung von Frau Dr. rer. nat. Anna-Lena Volckmar unter dem Titel „Fine Mapping of a GWAS-Derived Obesity Candidate Region on Chromosome 16p11.2“ (Volckmar et al. 2015). Diese Veröffentlichung gibt einen Überblick über die in diesem chromosomalen Bereich durch unsere Arbeitsgruppe detektierten Varianten, überprüft kodierende Varianten in einem größeren Kollektiv und ordnet ihre Assoziation zu Adipositas ein.

Ohne das laborexperimentelle Screening und die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit in den Exons 3 bis 9 erhoben und beschrieben wurden, wäre in dieser Veröffentlichung keine zusammenfassende Darstellung der chromosomalen Region 16p11.2 möglich gewesen. Die molekulargenetische Untersuchung von *TUFM* in einer Kohorte von 95 Individuen mittels Mutationsscreening und Genotypisierung war nötig, um in der Zusammenschau mit den anderen erhobenen genetischen Befunden in diesem chromosomalen Bereich eine abschließende Aussage zum GWAS-Befund machen zu können. Die Frage, welcher genomische Locus am ehesten eine Assoziation zu Adipositas aufweist, hätte ohne das Screening von *TUFM* nicht abschließend beantwortet und veröffentlicht werden können (Volckmar et al. 2015).

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Mutationsscreening mit anschließender Genotypisierung eines möglichen Kandidatengens für Adipositas. Bei diesem Screening der chromosomalen Region 16p11.2 wurden neben dem hier untersuchten Gen *TUFM* noch andere mögliche Kandidatengene (*SH2B1*, *APOBR48*, *SULT1A1*, *SULT1A2* und *SULT1A3*) in dieser Region untersucht und die Ergebnisse gemeinsam veröffentlicht (Volckmar et al. 2015).

Das Screening fand in einer Population von 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen statt und wurde mit verschiedenen laborexperimentellen Verfahren wie PCR, dHPLC, SSCP, RFLP und ARMS-PCR durchgeführt. Es wurden Mutationen bzw. Polymorphismen gesucht, die in möglicher Assoziation mit erhöhtem Körpergewicht stehen und einen Einfluss von *TUFM* auf den übergewichtigen Phänotyp erklären könnten. Im Anschluss an die Genotypisierung wurden die Resultate mit einer Kontrollgruppe verglichen und die Arbeit abschließend bewertet.

Die Diskussion beginnt mit einer Bewertung der erzielten Ergebnisse, erörtert anschließend das Probandenkollektiv und betrachtet danach die verwendeten Methoden. Am Ende wird die Fragestellung der vorliegenden Arbeit kritisch beurteilt und auf die Veröffentlichung eingegangen, in die die Ergebnisse dieser Arbeit eingeflossen sind (Volckmar et al. 2015).

4.1 Das Kandidatengen *TUFM*

4.1.1 Die gefundenen SNPs rs8061877, rs61737565 und rs4788099

Alle in dieser Arbeit gefundenen SNPs kommen im betrachteten Studienkollektiv von 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen seltener vor als in einer normalverteilten erwachsenen europäischen Kontrollgruppe (CEU-Vergleichsgruppe). Der überwiegende Teil der genotypisierten 95 extrem adipösen Kinder und Jugendlichen weisen den Wildtyp in den gefundenen SNPs auf. Erweitert man die Kontrollgruppe, betrachtet man also die MAF anderer Bevölkerungsgruppen (ausgehend von den Daten des *1000 genomes* Projekts), weichen die in dieser Arbeit erhobenen MAFs weiterhin auffällig ab. Die Limitation in der Aussagekraft der erhobenen Daten liegt darin, dass die gewählte Fallgruppe für einen bestimmten Genotyp angereichert war. Es lässt sich daher lediglich vermuten, dass in unserem Kollektiv eine starke Assoziation des Wildtyps mit einem erhöhten BMI vorliegt. Allgemeingültige Aussagen lassen sich jedoch aufgrund fehlender Normalverteilung der genotypisierten Individuen nicht treffen.

In der Literatur sind zurzeit insgesamt 85 synonyme, 128 Missense und 3 Loss-of-function Mutationen in *TUFM* beschrieben (Daten des ExAC-Browsers des Broadinstitutes [<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000178952>], Lek et al. 2015, zuletzt abgerufen

am 09.07.2016). Laut den Daten des „Exome Variant Servers“ (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA [<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>], zuletzt abgerufen am 09.07.2016) weist keiner der gefundenen SNPs eine funktionelle Relevanz auf. *TUFM* ist nach den Daten des „GWAS-Katalogs“ (GWAS Catalog - The NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies [<http://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=tufm>], Welter et al. 2014, zuletzt abgerufen am 20.08.2016) durch mehrere GWAS mit den Merkmalen Adipositas und dem Bildungsgrad (*engl.* educational attainment) assoziiert (Rietveld et al. 2013; Rietveld et al. 2014). Die durchgeführte *in silico* Analyse sagt für die gefundenen SNPs lediglich die Ausprägung von Polymorphismen hervor. Nichtsdestotrotz ist die Überprüfung dieser signifikanten Ergebnisse in einem größeren Kollektiv mit mehr als 95 Probanden erforderlich. Weitere *in silico* Analysen mit in Zukunft verfügbaren Daten wären ebenfalls denkbar. Funktionelle Analysen könnten Klarheit bringen, ob sich durch diese SNPs Effekte auf die Regulation von Proteinen oder den Energiehaushalt ergeben.

Die Schwierigkeit der erhobenen Ergebnisse liegt darin, dass alle detektierten SNPs im intronischen, nicht kodierenden Bereich des Genoms liegen. Es ist nicht ganz klar, welche genaue Relevanz für Adipositas daraus folgt. Es ist allgemein bekannt, dass Introns keine Proteine kodieren (Jo und Choi 2015). Trotz allem müssen Introns eine Relevanz für die Proteinsynthese haben, da sich das humane Genom vom Genom des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* lediglich in seiner Zahl an Introns unterscheidet; Mensch und Fadenwurm weisen beide ca. 20.000 Protein-kodierende Bereiche auf (Amaral und Mattick 2008). Einer gängigen Theorie nach könnten intronische Bereiche als eine Art „mitteilende RNA“ (*engl.* „informational RNA“) dienen, die Informationen über Transkriptions- und Regulationsfaktoren enthalten und sich gegenseitig beeinflussen (Mattick 1994). Sie sollen sog. non-protein-coding RNAs (ncRNAs) wie snoRNA, miRNA, siRNA, piRNA und long-ncRNA herstellen, welche wiederum mannigfaltige Einflüsse auf andere Regulationen und Genexpressionen haben (Rearick et al. 2010).

Das Wildtyp-Allel von *TUFM*, das im genotypisierten Kollektiv überwog, ist stark konserviert und findet sich in allen Menschenaffen, für die die Sequenz von *TUFM* vorliegt. Vergleicht man die genomische Wildtyp-Sequenz von *TUFM* zwischen Mensch und Menschenaffe, so ähnelt sie sich zu knapp über 98% (nach *Ensembl Build 84* - veröffentlicht im März 2016 [<http://www.ensembl.org/index.html>], ermittelt mit dem „BLAST - Basic Local Alignment Search Tool“ [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], Kent 2002, zuletzt abgerufen am 09.07.2016).

Neueste Forschungsarbeiten deuten ein verändertes Methylierungsmuster von Promotern und Enhancern für *TUFM* an, die z.T. im intronischen Bereich liegen. Diese Methylierungen in bestimmten Bereichen der Genexpression von *TUFM* und 27 anderen Adipositas-assoziierten Genen sollen mit Risikoallelen für Adipositas korreliert sein. Dies zeigt erneut die Relevanz

nicht kodierender Bereiche für die Regulation und Transkription von Proteinen (Voisin et al. 2015).

Inwieweit alle diese Annahmen und Forschungsergebnisse auf *TUFM* und seine intronischen Bereiche zutreffen, können nur weitere funktionelle Studien und ein besseres Verständnis der genomischen Mechanismen in der Zukunft klären.

4.2 Auswahl des Probandenkollektivs

Adipositas ist eine polygenetische Krankheit, deren Gründe in vielen verschiedenen Abschnitten des Genoms zu suchen sind (siehe hierzu auch Abschnitt 1.6.5). Bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Abschnitt des Genoms hatten vorherige Arbeiten eine Assoziation zu Adipositas gezeigt (Speliotes et al. 2010). Eine genaue Definition der zu betrachtenden Phänotypen ist im Vorfeld der laborexperimentellen Untersuchung von hoher Wichtigkeit. 90 der an dieser Arbeit beteiligten extrem adipösen Kinder und Jugendlichen wiesen zur Sicherstellung dieser Definition die gleichen Einschlusskriterien wie eine Homozygotie für das Risiko-Allel Thymin im SNP rs2008514 auf. Die anderen fünf Individuen waren alle heterozygot im Bereich dieses SNPs. Bei dem Screening handelte es sich daher nicht um eine normalverteilte repräsentative Kohorte (siehe hierzu auch den Abschnitt „Probandenkollektiv“ und folgende auf S.24).

4.3 Methoden des Mutationsscreenings

4.3.1 PCR

Die PCR ist eine elegante, einfache, schnelle und einfach durchzuführende Methode zur enzymatischen Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Abschnitts (Garibyan und Avashia 2013). Da sämtliche Versuche dieser Arbeit auf der genauen und sorgfältigen Amplifizierung der DNA beruhen, wurde bei der Entwicklung geeigneter PCR-Protokolle eine besonders große Sorgfalt gezeigt. Mithilfe gängiger und bewährter Software wurden passgenaue Primer synthetisiert (siehe hierzu Abschnitt 2.5), die nach verschiedenen Aspekten in ihrem Annealing-Verhalten optimiert wurden (Chuang et al. 2013). Die dafür verwendete Genomsequenz von *TUFM* war zum Zeitpunkt des laborexperimentellen Screenings beim Ensembl-Genome-Browser frei verfügbar (hg19, NCBI 37, zurzeit nur noch abrufbar bei NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/>], zuletzt abgerufen am 12.01.16). Ziel der Optimierung war es, eine hohe Ausbeute an weiter zu verwendender DNA zu erhalten, die möglichst rein sein sollte (z.B. keine unerwünschte Amplifizierung des Pseudogens von *TUFM*, siehe auch Abschnitt 1.7.2.1 „Eigenschaften von *TUFM*“ auf S.20). Eine wichtige Limitation der PCR ist eine mögliche Kontaminierung der gewünschten zu amplifizierenden DNA durch unerwünschte DNA (Garibyan und Avashia 2013). Um diese Gefahr

weitestgehend zu minimieren, wurde in den Räumen des Labors streng in einen Vor- und einen Nach-PCR-Raum unterschieden. Eine weitere Schwachstelle der PCR liegt in Basen-Fehlern des synthetisierten Stranges, die die *Taq*-Polymerase zufällig fälschlicherweise einbaut. Bei einer anschließenden Sequenzierung kann es zur Missdeutung dieser Basen-Fehler als SNP kommen (Garibyan und Avashia 2013).

Generell war die in der PCR-produzierte DNA-Menge jedoch ausreichend und von genügender Qualität für die Methoden des Mutationsscreenings wie SSCP oder dHPLC.

4.3.2 SSCP

Die SSCP ist ein einfaches und relativ kostengünstiges Verfahren, das mit einer genügend hohen Sensitivität das Mutationsscreening erlaubt. Der Einsatz von 2 verschiedenen Lauftemperaturen erhöht die Sensitivität nochmals etwas, so dass man von einer Sensitivität von bis zu 95% bei DNA-Fragmenten unter 200 bp ausgehen kann (Sheffield et al. 1993, Fujita und Silver 1994). Die Sensitivität ist jedoch abhängig von den Versuchsbedingungen; es gibt viele Fehlerquellen, die durch standardisierte Abläufe weitestgehend minimiert wurden. Trotz der existierenden Standards und häufigen Wiederholungen gelang es nicht, zufriedenstellende Bedingungen für die SSCP von Fragment 3 zu schaffen, so dass auf die dHPLC ausgewichen werden musste.

4.3.3 dHPLC

Die dHPLC ist ein schnelles Verfahren zur Detektion von Mutationen mit gleichzeitig wenig potentiellen Fehlerquellen. Ihre Sensitivität für jegliche Art von Veränderungen in der Basenabfolge ist im Vergleich zu anderen Methoden des Mutationsscreenings wie z.B. der SSCP deutlich höher (Eng et al. 2001). Dem gegenüber steht ein etwas höherer Preis als bei der SSCP und die Notwendigkeit teurer, wartungsanfälliger Geräte. Durch den direkten Vergleich des resultierenden Bandenmusters der analysierten Probe mit dem vorher bestimmten Muster des Wildtyps lassen sich rasch geeignete Kandidaten für eine nachfolgende Sequenzanalyse finden. Die Geschwindigkeit dieses Verfahrens ist ebenfalls sehr hoch, so dass dieses Verfahren nicht nur im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Wahl beim Mutationsscreening darstellt (O'Donovan et al. 1998). Durch eine standardisierte Etablierung der verschiedenen idealen Laufbedingungen wurden in den Versuchen dieser vorliegenden Arbeit zu nahezu 100% aller Sequenzvariationen entdeckt, so dass Fehler beim Screening weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

4.3.4 Sequenzierung

Nachdem durch Verfahren wie die SSCP und die dHPLC geeignete Kandidaten-DNA für die Sequenzierung identifiziert wurden, wurden die entsprechenden Proben an ein Speziallabor zusammen mit einer Wildtyp-DNA gesendet. Die resultierenden Basenabfolgen ließen sich

mittels einer Spezialsoftware (DNASar Version 10.1.0, Lasergene, Madison, Wisconsin, USA, Burland 2000) vergleichen.

Das im Rahmen dieser Arbeit gewählte Verfahren, zuerst geeignete Proben zu screenen und anschließend zur Sequenzierung zu schicken, wurde aus Kostengründen gewählt. So war dieses Vorgehen günstiger, als die chromosomale Region 16p11.2 aller beteiligten Probanden für *TUFM* ohne vorherige Mutationsdetektion zu sequenzieren. In Zukunft wird dieser „Umweg“ immer weniger attraktiver werden. Die Kosten für die Sequenzierung des gesamten Genoms des Menschen lagen im Jahr 2007 bei 10 Millionen US-Dollar und werden in kürzester Zeit einen Preis von ca. 1000 US-Dollar pro Genom erreichen (Christensen et al. 2015). Im Zuge dieser rapiden Kostensenkung ist es bereits jetzt möglich, bestimmte wissenschaftlich interessante Bereiche des Genoms ohne vorheriges Screening zu analysieren; mögliche Fehlerquellen durch die Screening-Verfahren im Vorfeld fallen dann weg.

4.4 Methoden der Genotypisierung

4.4.1 ARMS-PCR

Die ARMS-PCR ist ein etabliertes Verfahren zur Genotypisierung in Laboren, die bereits ausreichend Erfahrung mit PCR-basierten Verfahren haben und für die sich ein teureres Verfahren wie z.B. ein MALDI-TOF Massenspektrometer nicht lohnt (Ye et al. 2001). Der Vorteil im Verfahren liegt in der schnellen Genotypisierung mit wenigen möglichen Fehlerquellen, da u.a. nur ein einziger Versuchsdurchlauf, nämlich ein etwas längerer Zyklus in einem Gradientencycler, benötigt wird, um Ergebnisse zu erhalten. Nichtsdestotrotz erforderte die ideale Verdünnung der 4 verschiedenen Primer miteinander im Rahmen dieser Arbeit einiges Experimentieren. Am Ende konnten jedoch zufriedenstellende Bedingungen gefunden werden und die Genotypisierung gelang problemlos.

4.4.2 RFLP

Überwiegend wurde im Rahmen der laborexperimentellen Bestätigung gefundener Varianten die RFLP benutzt. Das Verfahren zeichnet sich durch seine Spezifität für vorher definierte Schnittstellen aus, braucht jedoch mehrere Schritte, um einwandfrei zu funktionieren (Berg Rasmussen 2012). Jeder dieser Schritte birgt potentielle Fehlerquellen. Es gelang häufig erst nach mehreren Versuchen, ideale Bedingungen für den enzymatischen Verdau zu schaffen. Die Verdau ist zudem zeitintensiv. Je nach verwendetem Enzym ist die RFLP teurer als andere vergleichbare Verfahren (Berg Rasmussen 2012). Dieses Verfahren war zwar für die Genotypisierung des kleinen, 95 Proben umfassenden Kollektivs ausreichend, in größeren Fallzahlen überwiegen jedoch eindeutig die Nachteile der RFLP, so dass hier zu anderen Verfahren geraten werden muss.

4.5 Validität und Reliabilität der Ergebnisse

Sämtliche Abweichungen vom Wildtyp-Muster in beiden Verfahren des Mutationsscreenings wurden unabhängig nochmals mittels dHPLC, RFLP oder ARMS-PCR bestätigt. Es wurden abschließend immer alle 95 Probanden mittels des gewählten Genotypisierungsverfahrens gleichzeitig untersucht, um Aussagen über alle vorhandenen Genotypen zu erlangen. Auffälligkeiten wurden weiter abgeklärt, nicht auswertbare Proben wurden solange wiederholt, bis die Ergebnisse eindeutig waren. Ließen sich die Befunde reproduzieren, erfolgte anschließend die Sequenzierung, die von zwei Individuen unabhängig voneinander ausgewertet wurde (Volckmar 2013). Mögliche Fehlerquellen oder das Übersehen einer Mutation in einer der 95 Proben konnte durch diesen mehrstufigen Prozess weitestgehend ausgeschlossen werden, weswegen die erhobenen Ergebnisse äußerst valide und reliabel sind.

4.6 Post-GWAS-Zeitalter

Diese Arbeit basierte auf der Annahme, dass ein bestimmter Bereich im Genom mit Adipositas assoziiert ist, wie es in großen GWA-Studien postuliert wurde (Speliotes et al. 2010). Trotz einer nachfolgenden und noch größerer Probandenzahl einschließenden GWA-Studie zum Thema Adipositas können durch diese genetischen Assoziationen erst ca. 2,7% der Varianz des BMIs erklärt werden (Locke et al. 2015).

Aus diesen Gründen wurde der Begriff des „Post-GWAS-Zeitalters“ im Jahr 2010 zum ersten Mal eingeführt und verwendet (Mills et al. 2010). Er beschreibt Limitationen der GWA-Studien und nennt gleichzeitig Herausforderungen, die nach Durchführung der großen GWA-Studien gemeistert werden müssen. Häufig erwähnte Limitationen sind u.a., dass das Ziel der GWA-Studien, Allelfrequenzen von SNPs mit Krankheiten zu korrelieren, keine Kausalzusammenhänge ziehen lässt. Da durch GWA-Studien überwiegend Bereiche im Genom mit Phänotypen korreliert werden, ist zudem oft unklar, welcher der in diesem Bereich liegenden SNPs wirklich mit dem Phänotyp assoziiert ist. Ein weiteres Problem liegt darin, dass die Mehrzahl der detektierten und mit einer Krankheit korrelierten SNPs in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms liegt. Welche Auswirkung Variationen in nicht-kodierenden Bereichen auf Genprodukte wie z.B. Proteine haben, ist noch nicht abschließend erforscht. Im besten Fall sind es regulatorische Funktionen oder bestimmte RNA-Typen, die durch diese SNPs beeinflusst werden, im schlechtesten Fall haben sie keinerlei Relevanz. Daraus ergibt sich aber folglich die Problematik, dass es zurzeit zu wenig biologisch-statistische Modelle gibt, um solche regulatorischen Funktionen beurteilen zu können (van der Sijde et al. 2014). Bereits im Internet verfügbare *in silico* Analyse-Datenbanken wie der z.B. im Rahmen dieser Arbeit benutzte „Mutation-taster 2“ (siehe Abschnitt 3.3) basieren zwar auf den heute gültigen Annahmen, jedoch muss man auch bei diesen Datenbanken resultierende Ergebnisse mit Vorsicht interpretieren. Ein häufiger Fehler ist es, SNPs, die zu Loss-of-function-Mutationen (LoF) führen, automatisch als

„krank machend“ und „gefährlich“ einzustufen, was nicht generell gleichzusetzen ist (Hou und Zhao 2013). Es wird davon ausgegangen, dass jedes menschliche Genom ca. 200-800 LoFs aufweist und man folgert daraus, dass es im Genom Mechanismen geben muss, die Effekte der LoFs abzumildern (MacArthur et al. 2012).

Häufig sind Ergebnisse von (insbesondere kleineren) GWA-Studien auch durch eine nicht repräsentative Auswahl der Probanden zumindest kritisch zu beurteilen (Abraham und Inouye 2015). Eine weitere Limitation liegt darin, dass sehr seltene Variationen im Genom nicht detektiert werden, da ihr p -Wert zur Detektion zu niedrig ist, diese seltenen Variationen allerdings schwere Phänotypen verursachen können (Schmidt und Willer 2015).

Die Herausforderungen des Post-GWAS-Zeitalters sind daher ein tiefliegenderes Verständnis über die genomischen Zusammenhänge zu entwickeln und biologisch-statistische Modelle zu erforschen, die funktionelle Analysen der gefundenen Variationen ermöglichen (Hou und Zhao 2013; Mills et al. 2010). Bis dahin lassen sich keine absoluten Aussagen über die Relevanz gefundener genetischer Variationen treffen, ganz gleich, ob sie im nicht-kodierenden oder kodierenden Bereich des Genoms liegen.

4.7 Zusammenfassende Beurteilung

Adipositas als polygenetisches Geschehen unterliegt einem ständigen Wandel in der Forschung. War im Jahr 2010 ein SNP nahe *TUFM* ein aussichtsreicher Kandidat für die Pathogenese von extremem Übergewicht (Speliotes et al. 2010), so zeigte sich in einer kürzlich veröffentlichten Originalarbeit unserer Arbeitsgruppe ein eher geringerer Einfluss *TUFMs* auf die Gewichtsregulation (Volckmar et al. 2015). Die in dieser Arbeit gefundenen Varianten können den GWAS-Befund nicht erklären. Andere Gene (wie z.B. *SH2B1* und *APOBR*) in der durch unserer Gruppe untersuchten chromosomalen Region 16p11.2 scheinen einen funktionelleren Einfluss auf die Entstehung von Adipositas zu haben (Volckmar et al. 2015). Da im Mutationsscreening im Rahmen dieser Arbeit lediglich intronische und bereits bekannte Varianten in *TUFM* gefunden wurden, liegt der Schluss nahe, dass *TUFM* wenig Relevanz auf die Entstehung von extremem Übergewicht hat. *In silico* Analysen weisen in dieselbe Richtung. Inwieweit die veränderte Allelverteilung in unserer für einen bestimmten Genotyp angereicherten Kohorte zur Genese von Adipositas im Kinder- und Jugendalter beiträgt, lässt sich durch diese Arbeit nicht abschließend beurteilen.

5 Zusammenfassung

Zu hohes Körpergewicht entwickelt sich zunehmend zu einem Problem in unserer heutigen Gesellschaft. War Übergewicht früher ein Zeichen von ausreichender Ernährung und somit evolutionär vorteilhaft, um in Zeiten des Überflusses ausreichend Nahrungsreserven für Hungerzeiten anzulegen, so verkehrt sich dieser evolutionäre Vorteil in der heutigen Umgebung mit ständig verfügbarer Nahrung in einen Nachteil. Da genetischen Faktoren eine große Rolle in der Entstehung von Übergewicht und Adipositas zugeschrieben wird, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Kandidatengen für Adipositas auf das Vorliegen von Mutationen zu überprüfen, die eine Assoziation mit erhöhtem Körpergewicht zulassen. Die Auswahl des Kandidatengens erfolgte aufgrund einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS), deren Ergebnisse als Grundlage für die Auswahl des Kandidatengens dienten.

Als Kandidat wurde das *Tu translation elongation factor mitochondrial gene (TUFM)* ausgewählt, da es bei einer genomweiten Assoziationsstudie als mögliches, assoziiertes Gen in der chromosomalen Region 16p11.2 in Frage kam. Vorherige Untersuchungen, Fallberichte und Befunde im Tiermodell deuteten einen Einfluss von *TUFM* auf die Gewichtsregulierung an. Wir führten daraufhin ein Mutationsscreening mit anschließender Genotypisierung an einer Gruppe von insgesamt 95 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen durch, die für einen bestimmten Genotyp angereichert war, und verglichen die Ergebnisse mit einer Normalpopulation.

Bei diesem Screening des Gens *TUFM* hinsichtlich einer Relevanz für die Ausprägung von Adipositas im Kindes- und Jugendalter wurden im Rahmen dieser Arbeit die Exons 3,4,5,6,7,8 und 9 betrachtet. Mehrere Exons wurden zum Screening in Fragmente zusammengelegt, so dass auch z.T. intronische Bereiche betrachtet wurden. Das Mutationsscreening fand mittels Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP) und denaturierender Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (dHPLC) statt, die sich anschließende Genotypisierung erfolgte mittels allelspezifischer PCR (ARMS-PCR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Innerhalb der betrachteten Fragmente fanden sich drei bereits beschriebene single-nucleotide-polymorphismen (SNPs), die alle im intronischen Bereich liegen. Als Vergleichsgruppe diente eine erwachsene europäische Normalpopulation des „1000 genomes Projects“. Es zeigten sich im Vergleich beider Gruppen deutlich Unterschiede in der Mittleren Allelfrequenz (MAF). Ausreichende Schlüsse für die Relevanz an der Entstehung von Adipositas lassen sich jedoch nur eingeschränkt ziehen, da die untersuchte Gruppe für einen bestimmten Genotyp angereichert war.

Die funktionelle Relevanz der gefundenen SNPs in *TUFM* und mögliche regulatorische Effekte sollten in weiteren folgenden Studien erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham, G., Inouye, M. (2015): Genomic risk prediction of complex human disease and its clinical application. *Current Opinion in Genetics & Development*. 33, 10–16
2. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R. (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 7, 248–249
3. Amaral, P.P., Mattick, J.S. (2008): Noncoding RNA in development. *Mammalian Genome*. 19, 454–492
4. Banks, W.A. (2012): Role of the blood-brain barrier in the evolution of feeding and cognition. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1264, 13–19
5. Belostotsky, R., Frishberg, Y., Entelis, N. (2012): Human mitochondrial tRNA quality control in health and disease: a channelling mechanism? *RNA Biol*. 9, 33–39
6. Berg Rasmussen, H. (2012): "Gel Electrophoresis - Principles and Basics; Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting". In: Magdeldin, S. (Hrsg.): *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Bd. 1: InTech. ISBN: 9789535104582
7. Blomain, E.S., Dirhan, D.A., Valentino, M.A., Kim, G.W., Waldman, S.A. (2013): Mechanisms of Weight Regain following Weight Loss. *ISRN Obes*. 2013, 210524
8. Bochukova, E.G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., Purmann, C., Blaszczyk, K., Saeed, S., Hamilton-Shield, J., Clayton-Smith, J., Rahilly, S., Hurles, M.E., Farooqi, I.S. (2010): Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*. 463, 666–670
9. Bosco, F., Castro, D., Briones, M.R. (2012): Neutral and stable equilibria of genetic systems and the hardy-weinberg principle: limitations of the chi-square test and advantages of auto-correlation functions of allele frequencies. *Front.Genet*. 3, 276

10. Burland, T.G. (2000): DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 132, 71–91
11. Caballero, B. (2007): The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol.Rev.* 29, 1–5
12. Chang, S.H., Pollack, L.M., Colditz, G.A. (2013): Life Years Lost Associated with Obesity-Related Diseases for U.S. Non-Smoking Adults. *PLoS One.* 8, e66550
13. Christensen, K.D., Dukhovny, D., Siebert, U., Green, R.C. (2015): Assessing the Costs and Cost-Effectiveness of Genomic Sequencing. *Journal of personalized medicine.* 5, 470–486
14. Chuang, L.Y., Cheng, Y.H., Yang, C.H. (2013): Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol.Lett.* 35, 1541–1549
15. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B. (1998): A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 392, 398–401
16. Cole, T.J., Bellizzi, M.C., Flegal, K.M., Dietz, W.H. (2000): Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 320, 1240–1243
17. Dempfle, A., Hinney, A., Heinzl-Gutenbrunner, M., Raab, M., Geller, F., Gudermann, T., Schafer, H., Hebebrand, J. (2004): Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J.Med.Genet.* 41, 795–800
18. Despres, J.P., Lemieux, I., Prud'homme, D. (2001): Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ.* 322, 716–720
19. Eckert, K.A., Kunkel, T.A. (1990): High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18, 3739–3744

20. Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, R.L. (1993): Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*. 14, 214–217
21. Eng, C., Brody, L., Wagner, T., Devilee, P., Vijg, J., Szabo, C., Tavtigian, S., Nathanson, K., Ostrander, E., Frank, T. (2001): Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *Journal of Medical Genetics*. 38, 824–833
22. Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., O'Rahilly, S. (1999): Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N.Engl.J.Med.* 341, 879–884
23. Farooqi, I.S., Volders, K., Stanhope, R., Heuschkel, R., White, A., Lank, E., Keogh, J., O'Rahilly, S., Creemers, J.W. (2007): Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 92, 3369–3373
24. Fehm, L., Kern, W., Peters, A. (2004): Body weight regulation through the central nervous system. The development of a pathogenetically based adiposity therapy. *Med.Klin.(Munich)*. 99, 674–679
25. Finkelstein, E.A., Trogdon, J.G., Cohen, J.W., Dietz, W. (2009): Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health.Aff.(Millwood)*. 28, w822-w831 (web exclusive)
26. Fisher, R.A. (1922): On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*. 85, 87–94
27. Flegal, K.M., Kit, B.K., Orpana, H., Graubard, B.I. (2013): Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 309, 71–82
28. Frueh, F.W., Noyer-Weidner, M. (2003): The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin.Chem.Lab.Med.* 41, 452–461

29. Fujita, K., Silver, J. (1994): Single-strand conformational polymorphism. PCR methods and applications. 4, 137–140

30. Gajjar, N.B. (2013): Hypothesis and its Testing. International Journal for Research in Education (IJRE). 2, 1–6

31. Garibyan, L., Avashia, N. (2013): Polymerase Chain Reaction. J Invest Dermatol. 133, e6

32. Goldapp, C., Mann, R. (2004): Zur Datenlage von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen. Prävention - Zeitschrift für Gesundheitsförderung. 1, 12–18

33. Gonzalez, J.R., Caceres, A., Esko, T., Cusco, I., Puig, M., Esnaola, M., Reina, J., Siroux, V., Bouzigon, E., Nadif, R., Reinmaa, E., Milani, L., Bustamante, M., Jarvis, D., Antó, J.M., Sunyer, J., Demenais, F., Kogevinas, M., Metspalu, A., Caceres, M., Perez-Jurado, L.A. (2014): A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity. Am.J.Hum.Genet.1–12

34. Guagnano, M.T., Manigrasso, M.R., Marinopicolli, M., Davi, G. (2007): What do we know about obesity? Clin.Ter. 158, 261–266

35. Gutierrez-Aguilar, R., Kim, D.H., Woods, S.C., Seeley, R.J. (2012): Expression of new loci associated with obesity in diet-induced obese rats: from genetics to physiology. Obesity (Silver Spring). 20, 306–312

36. Hardy, G.H. (1908): MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. Science. 28, 49–50

37. Hartl, D.L., Clarke, A.G. (2007): Principles of Population Genetics. 4. Aufl. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc. ISBN: 9780878933082

38. Haslam, D.W., James, W.P. (2005): Obesity. Lancet. 366, 1197–1209

39. Hauner, H. (2007): DGEM - Adipositas-Leitlinien 2007. Zuletzt abgerufen am 10.03.2012

40. Hayward-Lester, A., Oefner, P.J., Sabatini, S., Doris, P.A. (1995): Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. Genome

41. Hebebrand, J., Hinney, A., Knoll, N., Volckmar, A.L., Scherag, A. (2013): Molecular genetic aspects of weight regulation. *Dtsch.Arztebl Int.* 110, 338–344
42. Hebebrand, J., Remschmidt, H. (1995): Body weight under genetic control. *Med.Klin.(Munich).* 90, 403–410
43. Hebebrand, J., Volckmar, A.L., Knoll, N., Hinney, A. (2010): Chipping away the 'missing heritability': GIANT steps forward in the molecular elucidation of obesity - but still lots to go. *Obes.Facts.* 3, 294–303
44. Hebebrand, J., Wulfhage, H., Goerg, T., Ziegler, A., Hinney, A., Barth, N., Mayer, H., Remschmidt, H. (2000): Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 24, 345–353
45. Hecht, M., Bromberg, Y., Rost, B. (2015): Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC genomics.* 16 Suppl 8, S1
46. Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1974): Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J.Virol.* 14, 1235–1244
47. Hinney, A., Bettecken, T., Tarnow, P., Brumm, H., Reichwald, K., Lichtner, P., Scherag, A., Nguyen, T.T., Schlumberger, P., Rief, W., Vollmert, C., Illig, T., Wichmann, H.E., Schafer, H., Platzer, M., Biebermann, H., Meitinger, T., Hebebrand, J. (2006): Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 91, 1761–1769
48. Hinney, A., Herrfurth, N., Schonhop, L., Volckmar, A.-L. (2015): Genetic and epigenetic mechanisms in obesity. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz.* 58, 154–158

49. Hinney, A., Vogel, C.I., Hebebrand, J. (2010): From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur.Child Adolesc.Psychiatry*. 19, 297–310
50. Hou, L., Zhao, H. (2013): A review of post-GWAS prioritization approaches. *Front.Genet*. 4, 280
51. Jacobsen, S.H., Olesen, S.C., Dirksen, C., Jorgensen, N.B., Bojsen-Moller, K.N., Kielgast, U., Worm, D., Almdal, T., Naver, L.S., Hvolris, L.E., Rehfeld, J.F., Wulff, B.S., Clausen, T.R., Hansen, D.L., Holst, J.J., Madsbad, S. (2012): Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects. *Obes.Surg*. 22, 1084–1096
52. Janssen, I. (2002): Body Mass Index, Waist Circumference, and Health Risk: Evidence in Support of Current National Institutes of Health Guidelines. *Arch.Intern.Med*. 162, 2074–2079
53. Jin, D.K. (2011): Systematic review of the clinical and genetic aspects of Prader-Willi syndrome. *Korean J.Pediatr*. 54, 55–63
54. Jo, B.-S., Choi, S.S. (2015): Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics & informatics*. 13, 112–118
55. Juonala, M., Magnussen, C.G., Berenson, G.S., Venn, A., Burns, T.L., Sabin, M.A., Srinivasan, S.R., Daniels, S.R., Davis, P.H., Chen, W., Sun, C., Cheung, M., Viikari, J.S., Dwyer, T., Raitakari, O.T. (2011): Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. *N.Engl.J.Med*. 365, 1876–1885
56. Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., Ritov, V.B. (2002): Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 51, 2944–2950
57. Kent, W.J. (2002): BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome research*. 12, 656–664
58. Knoll, N., Jarick, I., Volckmar, A.-L., Klingenspor, M., Illig, T., Grallert, H., Gieger, C., Wichmann, H.-E., Peters, A., Hebebrand, J., Scherag, A., Hinney, A. (2013): Gene set of nuclear-encoded mitochondrial regulators is enriched for common inherited variation in obesity. *PLoS ONE*. 8, e55884

59. Kotani, K., Wilden, P., Pillay, T.S. (1998): SH2-Balpa is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase. *Biochem.J.* 335 (Pt 1), 103–109
60. Kromeyer-Hauschild, K., Wabitsch, M., Kunze, D., Geller, F., Geiß, H.C., Hesse, V., Hippel, A. von, Jaeger, U., Johnsen, D., Korte, W., Menner, K., Müller, G., Müller, J.M., Niemann-Pilatus, A., Remer, T., Schaefer, F., Wittchen, H.-U., Zabransky, S., Zellner, K., Ziegler, A., Hebebrand, J. (2001): Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 149, 807–818
61. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Gruters, A. (1998): Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat.Genet.* 19, 155–157
62. Lean, M.E., Han, T.S., Morrison, C.E. (1995): Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ.* 311, 158–161
63. Lee, D.E., Brown, J.L., Rosa, M.E., Brown, L.A., Perry, R.A., JR, Washington, T.A., Greene, N.P. (2016): Translational machinery of mitochondrial mRNA is promoted by physical activity in Western diet-induced obese mice. *Acta physiologica*, apha.12687
64. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H. (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*e3923
65. Lee, Y.S. (2009): The role of genes in the current obesity epidemic. *Ann.Acad.Med.Singapore.* 38, 45–43
66. Lei, Y., Wen, H., Yu, Y., Taxman, D.J., Zhang, L., Widman, D.G., Swanson, K.V., Wen, K.W., Damania, B., Moore, C.B., Giguere, P.M., Siderovski, D.P., Hiscott, J., Razani, B., Semenkovich, C.F., Chen, X., Ting, J.P. (2012): The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity.* 36, 933–946
67. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep,

E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glatffelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramée, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., Jones, A.R. (2007): Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445, 168–176

68. Lek, M., Karczewski, K., Minikel, E., Samocha, K., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A., Ware, J., Hill, A., Cummings, B., Tukiainen, T., Birnbaum, D., Kosmicki, J., Duncan, L., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Cooper, D., Depristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M., Moonshine, A.L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G., Poplin, R., Rivas, M., Ruano-Rubio, V., Ruderfer, D., Shakir, K., Stenson, P., Stevens, C., Thomas, B., Tiao, G., Tusie-Luna, M., Weisburd, B., Won, H.-H., Yu, D., Altshuler, D., Ardissino, D., Boehnke, M., Danesh, J., Roberto, E., Florez, J., Gabriel, S., Getz, G., Hultman, C., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B., Palotie, A., Purcell, S., Saleheen, D., Scharf, J., Sklar, P., Patrick, S., Tuomilehto, J., Watkins, H., Wilson, J., Daly, M., MacArthur, D. (2015): Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv*30338

69. Ling, M., Merante, F., Chen, H.S., Duff, C., Duncan, A.M., Robinson, B.H. (1997): The human mitochondrial elongation factor tu (EF-Tu) gene: cDNA sequence, genomic localization, genomic structure, and identification of a pseudogene. *Gene*. 197, 325–336

70. Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M.L., Hall, K.D., Gortmaker, S.L., Swinburn, B.A., James, W.P.T., Wang, Y., McPherson, K. (2015): Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *The Lancet*. 385, 2510–2520

71. Locke, A.E., Kahali, B., Berndt, S.I., Justice, A.E., Pers, T.H., Day, F.R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M.L., Yang, J., Croteau-Chonka, D.C., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gustafsson, S., Kutalik, Z., Luan, J., Mägi, R., Randall, J.C., Winkler, T.W., Wood, A.R., Workalemahu, T., Faul, J.D., Smith, J.A., Zhao, J.H., Zhao, W., Chen, J., Fehrmann, R., Hedman, Å.K., Karjalainen, J., Schmidt, E.M., Absher, D., Amin, N., Anderson, D., Beekman, M., Bolton, J.L., Bragg-Gresham, J.L., Buyske, S., Demirkan, A., Deng, G., Ehret, G.B., Feenstra, B., Feitosa, M.F., Fischer, K., Goel, A., Gong, J., Jackson, A.U., Kanoni, S., Kleber, M.E., Kristiansson, K., Lim, U., Lotay, V., Mangino, M., Leach, I.M., Medina-Gomez, C., Medland, S.E., Nalls, M.A., Palmer, C.D., Pasko, D., Pechlivanis, S., Peters, M.J., Prokopenko, I., Shungin, D., Stančáková, A., Strawbridge, R.J., Sung, Y.J., Tanaka, T., Teumer, A., Trompet, S., van der Laan, Sander W, van Setten, J., van Vliet-Ostaptchouk, J.V., Wang, Z., Yengo, L., Zhang, W., Isaacs, A., Albrecht, E., Ärnlöv, J., Arscott, G.M., Attwood, A.P., Bandinelli, S., Barrett, A., Bas, I.N., Bellis, C., Bennett, A.J., Berne, C., Blagieva, R., Blüher, M., Böhringer, S., Bonnycastle, L.L., Böttcher, Y., Boyd, H.A., Bruinenberg, M., Caspersen, I.H., Chen, Y.-D.I., Clarke, R., Daw, E.W., de Craen, Anton J M, Delgado, G., Dimitriou, M., Doney, A.S.F., Eklund, N., Estrada, K., Eury, E., Folkersen, L., Fraser, R.M., Garcia, M.E., Geller, F., Giedraitis, V., Gigante, B., Go, A.S., Golay, A., Goodall, A.H., Gordon, S.D., Gorski, M., Grabe, H.-J., Grallert, H., Grammer, T.B., Gräßler, J., Grönberg, H., Groves, C.J., Gusto, G., Haessler, J., Hall, P., Haller, T., Hallmans, G., Hartman, C.A., Hassinen, M., Hayward, C., Heard-Costa, N.L., Helmer, Q., Hengstenberg, C., Holmen, O., Hottenga, J.-J., James, A.L., Jeff, J.M., Johansson, Å., Jolley, J., Juliusdottir, T., Kinnunen, L., Koenig, W., Koskenvuo, M., Kratzer, W., Laitinen, J., Lamina, C., Leander, K., Lee, N.R., Lichtner, P., Lind, L., Lindström, J., Lo, K.S., Lobbens, S., Lorbeer, R., Lu, Y., Mach, F., Magnusson, P.K.E., Mahajan, A., McArdle, W.L., McLachlan, S., Menni, C., Merger, S., Mihailov, E., Milani, L., Moayyeri, A., Monda, K.L., Morken, M.A., Mulas, A., Müller, G., Müller-Nurasyid, M., Musk, A.W., Nagaraja, R., Nöthen, M.M., Nolte, I.M., Pilz, S., Rayner, N.W., Renstrom, F., Rettig, R., Ried, J.S., Ripke, S., Robertson, N.R., Rose, L.M., Sanna, S., Scharnagl, H., Scholtens, S., Schumacher, F.R., Scott, W.R., Seufferlein, T., Shi, J., Smith, A.V., Smolonska, J., Stanton, A.V., Steinthorsdottir, V., Stirrups, K., Stringham, H.M., Sundström, J., Swertz, M.A., Swift, A.J., Syvänen, A.-C., Tan, S.-T., Tayo, B.O., Thorand, B., Thorleifsson, G., Tyrer, J.P., Uh, H.-W., Vandenput, L., Verhulst, F.C., Vermeulen, S.H., Verweij, N., Vonk, J.M., Waite, L.L., Warren, H.R., Waterworth, D., Weedon, M.N., Wilkens, L.R., Willenborg, C., Wilsaard, T., Wojczynski, M.K., Wong, A., Wright, A.F., Zhang, Q., The LifeLines Cohort Study, Brennan, E.P., Choi, M., Dastani, Z., Drong, A.W., Eriksson, P., Franco-Cereceda, A., Gådin, J.R., Gharavi, A.G., Goddard, M.E., Handsaker, R.E., Huang, J., Karpe, F., Kathiresan, S., Keildson, S., Kiryluk, K., Kubo, M., Lee, J.-Y., Liang, L., Lifton, R.P., Ma, B., McCarroll, S.A., McKnight, A.J., Min, J.L., Moffatt, M.F., Montgomery, G.W., Murabito, J.M.,

Nicholson, G., Nyholt, D.R., Okada, Y., Perry, J.R.B., Dorajoo, R., Reinmaa, E., Salem, R.M., Sandholm, N., Scott, R.A., Stolk, L., Takahashi, A., Tanaka, T., van 't Hooft, Ferdinand M, Vinkhuyzen, A.A.E., Westra, H.-J., Zheng, W., Zondervan, K.T., The ADIPOGen Consortium, The AGEN-BMI Working Group, The CARDIOGRAMplusC4D Consortium, The CKDGen Consortium, The GLGC, The ICBP, The MAGIC Investigators, The MuTHER Consortium, The MIGen Consortium, The PAGE Consortium, The ReproGen Consortium, The GENIE Consortium, The International Endogene Consortium, Heath, A.C., Arveiler, D., Bakker, S.J.L., Beilby, J., Bergman, R.N., Blangero, J., Bovet, P., Campbell, H., Caulfield, M.J., Cesana, G., Chakravarti, A., Chasman, D.I., Chines, P.S., Collins, F.S., Crawford, D.C., Cupples, L.A., Cusi, D., Danesh, J., Faire, U. de, den Ruijter, H.M., Dominiczak, A.F., Erbel, R., Erdmann, J., Eriksson, J.G., Farrall, M., Felix, S.B., Ferrannini, E., Ferrières, J., Ford, I., Forouhi, N.G., Forrester, T., Franco, O.H., Gansevoort, R.T., Gejman, P.V., Gieger, C., Gottesman, O., Gudnason, V., Gyllenstein, U., Hall, A.S., Harris, T.B., Hattersley, A.T., Hicks, A.A., Hindorf, L.A., Hingorani, A.D., Hofman, A., Homuth, G., Hovingh, G.K., Humphries, S.E., Hunt, S.C., Hyppönen, E., Illig, T., Jacobs, K.B., Jarvelin, M.-R., Jöckel, K.-H., Johansen, B., Jousilahti, P., Jukema, J.W., Jula, A.M., Kaprio, J., Kastelein, J.J.P., Keinänen-Kiukaanniemi, S.M., Kiemeny, L.A., Knekt, P., Kooner, J.S., Kooperberg, C., Kovacs, P., Kraja, A.T., Kumari, M., Kuusisto, J., Lakka, T.A., Langenberg, C., Le Marchand, L., Lehtimäki, T., Lysenko, V., Männistö, S., Marette, A., Matise, T.C., McKenzie, C.A., McKnight, B., Moll, F.L., Morris, A.D., Morris, A.P., Murray, J.C., Nelis, M., Ohlsson, C., Oldehinkel, A.J., Ong, K.K., Madden, P.A.F., Pasterkamp, G., Peden, J.F., Peters, A., Postma, D.S., Pramstaller, P.P., Price, J.F., Qi, L., Raitakari, O.T., Rankinen, T., Rao, D.C., Rice, T.K., Ridker, P.M., Rioux, J.D., Ritchie, M.D., Rudan, I., Salomaa, V., Samani, N.J., Saramies, J., Sarzynski, M.A., Schunkert, H., Schwarz, P.E.H., Sever, P., Shuldiner, A.R., Sinisalo, J., Stolk, R.P., Strauch, K., Tönjes, A., Trégouët, D.-A., Tremblay, A., Tremoli, E., Virtamo, J., Vohl, M.-C., Völker, U., Waeber, G., Willemsen, G., Witteman, J.C., Zillikens, M.C., Adair, L.S., Amouyel, P., Asselbergs, F.W., Assimes, T.L., Bochud, M., Boehm, B.O., Boerwinkle, E., Bornstein, S.R., Bottinger, E.P., Bouchard, C., Cauchi, S., Chambers, J.C., Chanoock, S.J., Cooper, R.S., de Bakker, Paul I W, Dedoussis, G., Ferrucci, L., Franks, P.W., Froguel, P., Groop, L.C., Haiman, C.A., Hamsten, A., Hui, J., Hunter, D.J., Hveem, K., Kaplan, R.C., Kivimäki, M., Kuh, D., Laakso, M., Liu, Y., Martin, N.G., März, W., Melbye, M., Metspalu, A., Moebus, S., Munroe, P.B., Njølstad, I., Oostra, B.A., Palmer, C.N.A., Pedersen, N.L., Perola, M., Pérusse, L., Peters, U., Power, C., Quertermous, T., Rauramaa, R., Rivadeneira, F., Saaristo, T.E., Saleheen, D., Sattar, N., Schadt, E.E., Schlessinger, D., Slagboom, P.E., Snieder, H., Spector, T.D., Thorsteinsdottir, U., Stumvoll, M., Tuomilehto, J., Uitterlinden, A.G., Uusitupa, M., van der Harst, P., Walker, M., Wallaschofski, H., Wareham,

N.J., Watkins, H., Weir, D.R., Wichmann, H.-E., Wilson, J.F., Zanen, P., Borecki, I.B., De-
loukas, P., Fox, C.S., Heid, I.M., O'Connell, J.R., Strachan, D.P., Stefansson, K., van Duijn,
C.M., Abecasis, G.R., Franke, L., Frayling, T.M., McCarthy, M.I., Visscher, P.M., Scherag, A.,
Willer, C.J., Boehnke, M., Mohlke, K.L., Lindgren, C.M., Beckmann, J.S., Barroso, I., North,
K.E., Ingelsson, E., Hirschhorn, J.N., Loos, R.J.F., Speliotes, E.K. (2015): Genetic studies of
body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 518, 197–206

72. Lowry, R. (2015): "Concepts and Applications of Inferential Statistics" in VassarStats:
Web Site for Statistical Computation. Poughkeepsie, NY, USA. Online-Publikation; [http://vas-
sarstats.net/textbook/index.html](http://vassarstats.net/textbook/index.html). Zuletzt abgerufen am 22.12.2015

73. MacArthur, D.G., Balasubramanian, S., Frankish, A., Huang, N., Morris, J., Walter, K., Jo-
stins, L., Habegger, L., Pickrell, J.K., Montgomery, S.B., Albers, C.A., Zhang, Z., Conrad,
D.F., Lunter, G., Zheng, H., Ayub, Q., DePristo, M.A., Banks, E., Hu, M., Handsaker, R.E.,
Rosenfeld, J., Fromer, M., Jin, M., Mu, X.J., Khurana, E., Ye, K., Kay, M., Saunders, G.I., Su-
ner, M.-M., Hunt, T., Barnes, I.H.A., Amid, C., Carvalho-Silva, D.R., Bignell, A.H., Snow, C.,
Yngvadottir, B., Bumpstead, S., Cooper, D.N., Xue, Y., Romero, I.G., 1000 Genomes Project
Consortium, Wang, J., Li, Y., Gibbs, R.A., McCarroll, S.A., Dermitzakis, E.T., Pritchard, J.K.,
Barrett, J.C., Harrow, J., Hurles, M.E., Gerstein, M.B., Tyler-Smith, C. (2012): A systematic
survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science (New York, N.Y.)*.
335, 823–828

74. Mattick, J.S. (1994): Introns: evolution and function. *Current Opinion in Genetics & Devel-
opment*. 4, 823–831

75. Max Rubner-Institut und das Bundesministerium für Ernährung (2008): Ergebnisbericht
Teil 1 - Nationale Verzehrsstudie II - Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugend-
lichen und Erwachsenen

76. McVean, G.A., The 1000 Genomes Project Consortium (2012): An integrated map of ge-
netic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491, 56–65

77. Mehta, C.R., Patel, N.R. (1983): A Network Algorithm for Performing Fisher's Exact Test
in $r \times c$ Contingency Tables. *Journal of the American Statistical Association*. 78, 427–434

78. Mi, H., Lazareva-Ulitsky, B., Loo, R., Kejariwal, A., Vandergriff, J., Rabkin, S., Guo, N., Muruganujan, A., Doremieux, O., Campbell, M.J., Kitano, H., Thomas, P.D. (2005): The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Research*. 33, D284-8
79. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215
80. Mills, I.G., Monteiro, A.N., Coetzee, G.A., Freedman, M.L., Biasi, M. de, Casey, G., Duggan, D., Risch, A., Plass, C., Liu, P., James, M., Vikis, H.G., Tichelaar, J.W., You, M., Gayther, S.A., on behalf of functional cancer genomics supported by the NIH Post-Genome Wide Association Initiative (2010): Principles for the post-GWAS functional characterisation of risk loci. Online-Publikation; <http://www.wikigenes.org/e/pub/e/84.html>. Zuletzt abgerufen am 16.01.2016
81. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., O'Rahilly, S. (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 387, 903–908
82. Montanari, A., Zhou, Y.F., D'Orsi, M.F., Bolotin-Fukuhara, M., Frontali, L., Francisci, S. (2013): Analyzing the suppression of respiratory defects in the yeast model of human mitochondrial tRNA diseases. *Gene*. 527, 1–9
83. Moss, A., Klenk, J., Simon, K., Thaiss, H., Reinehr, T., Wabitsch, M. (2012): Declining prevalence rates for overweight and obesity in German children starting school. *Eur.J.Pediatr.* 171, 289–299
84. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350
85. Nagel, G., Wabitsch, M., Galm, C., Berg, S., Brandstetter, S., Fritz, M., Klenk, J., Peter, R., Prokopchuk, D., Steiner, R., Stroth, S., Wartha, O., Weiland, S.K., Steinacker, J. (2009): Secular changes of anthropometric measures for the past 30 years in South-West Germany. *Eur.J.Clin.Nutr.* 63, 1440–1443

86. Nan, C., Guo, B., Warner, C., Fowler, T., Barrett, T., Boomsma, D., Nelson, T., Whitfield, K., Beunen, G., Thomis, M., Maes, H.H., Derom, C., Ordoñana, J., Deeks, J., Zeegers, M. (2012): Heritability of body mass index in pre-adolescence, young adulthood and late adulthood. *Eur.J.Epidemiol.* 27, 247–253
87. Neel, J.V. (1962): Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am.J.Hum.Genet.* 14, 353–362
88. Nelms, K., O'Neill, T.J., Li, S., Hubbard, S.R., Gustafson, T.A., Paul, W.E. (1999): Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain. *Mamm.Genome.* 10, 1160–1167
89. Ng, P.C., Henikoff, S. (2001): Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research.* 11, 863–874
90. Niemann, B., Chen, Y., Teschner, M., Li, L., Silber, R.-E., Rohrbach, S. (2011): Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *Journal of the American College of Cardiology.* 57, 577–585
91. O'Donovan, M.C., Oefner, P.J., Roberts, S.C., Austin, J., Hoogendoorn, B., Guy, C., Speight, G., Upadhyaya, M., Sommer, S.S., McGuffin, P. (1998): Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics.* 52, 44–49
92. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86, 2766–2770
93. Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science.* 238, 336–341
94. Pruim, R.J., Welch, R.P., Sanna, S., Teslovich, T.M., Chines, P.S., Gliedt, T.P., Boehnke, M., Abecasis, G.R., Willer, C.J. (2010): LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics.* 26, 2336–2337

95. Qiao, Q., Nyamdorj, R. (2010): The optimal cutoff values and their performance of waist circumference and waist-to-hip ratio for diagnosing type II diabetes. *Eur.J.Clin.Nutr.* 64, 23–29

96. Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S.S., Fedorova, L., Fedorov, A. (2010): Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Research.* 39, 2357–2366

97. Rezek, M. (1976): The role of insulin in the glucostatic control of food intake. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 54, 650–665

98. Rietveld, C.A., Esko, T., Davies, G., Pers, T.H., Turley, P., Benyamin, B., Chabris, C.F., Emilsson, V., Johnson, A.D., Lee, J.J., Leeuw, C.d., Marioni, R.E., Medland, S.E., Miller, M.B., Rostapshova, O., Lee, Sven J. van der, Vinkhuyzen, A.A.E., Amin, N., Conley, D., Derringer, J., van Duijn, C.M., Fehrmann, R., Franke, L., Glaeser, E.L., Hansell, N.K., Hayward, C., Iacono, W.G., Ibrahim-Verbaas, C., Jaddoe, V., Karjalainen, J., Laibson, D., Lichtenstein, P., Liewald, D.C., Magnusson, P.K.E., Martin, N.G., McGue, M., McMahon, G., Pedersen, N.L., Pinker, S., Porteous, D.J., Posthuma, D., Rivadeneira, F., Smith, B.H., Starr, J.M., Tie-meier, H., Timpson, N.J., Trzaskowski, M., Uitterlinden, A.G., Verhulst, F.C., Ward, M.E., Wright, M.J., Smith, G.D., Deary, I.J., Johannesson, M., Plomin, R., Visscher, P.M., Benjamin, D.J., Cesarini, D., Koellinger, P.D. (2014): Common genetic variants associated with cognitive performance identified using the proxy-phenotype method. *PNAS.* 111, 13790–13794

99. Rietveld, C.A., Medland, S.E., Derringer, J., Yang, J., Esko, T., Martin, N.W., Westra, H.-J., Shakhbazov, K., Abdellaoui, A., Agrawal, A., Albrecht, E., Alizadeh, B.Z., Amin, N., Barnard, J., Baumeister, S.E., Benke, K.S., Bielak, L.F., Boatman, J.A., Boyle, P.A., Davies, G., Leeuw, C.d., Eklund, N., Evans, D.S., Fehrmann, R., Fischer, K., Gieger, C., Gjessing, H.K., Hägg, S., Harris, J.R., Hayward, C., Holzapfel, C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Ingelsson, E., Jacobsson, B., Joshi, P.K., Jugessur, A., Kaakinen, M., Kanoni, S., Karjalainen, J., Kolcic, I., Kristiansson, K., Kutalik, Z., Lahti, J., Lee, S.H., Lin, P., Lind, P.A., Liu, Y., Lohman, K., Loitfelder, M., McMahon, G., Vidal, P.M., Meirelles, O., Milani, L., Myhre, R., Nuotio, M.-L., Oldmeadow, C.J., Petrovic, K.E., Peyrot, W.J., Polašek, O., Quaye, L., Reinmaa, E., Rice, J.P., Rizzi, T.S., Schmidt, H., Schmidt, R., Smith, A.V., Smith, J.A., Tanaka, T., Terracciano, A., Loos, Matthijs J. H. M. van der, Vitart, V., Völzke, H., Wellmann, J., Yu, L., Zhao, W., Allik, J., Attia, J.R., Bandinelli, S., Bastardot, F., Beauchamp, J., Bennett, D.A., Berger, K., Bierut, L.J., Boomsma, D.I., Bültmann, U., Campbell, H., Chabris, C.F., Cherkas, L., Chung, M.K.,

Cucca, F., Andrade, M.d., Jager, P.L.D., Neve, J.-E.D., Deary, I.J., Dedoussis, G.V., Deloukas, P., Dimitriou, M., Eiríksdóttir, G., Elderson, M.F., Eriksson, J.G., Evans, D.M., Faul, J.D., Ferrucci, L., Garcia, M.E., Grönberg, H., Guðnason, V., Hall, P., Harris, J.M., Harris, T.B., Hastie, N.D., Heath, A.C., Hernandez, D.G., Hoffmann, W., Hofman, A., Holle, R., Holliday, E.G., Hottenga, J.-J., Iacono, W.G., Illig, T., Järvelin, M.-R., Kähönen, M., Kaprio, J., Kirkpatrick, R.M., Kowgier, M., Latvala, A., Launer, L.J., Lawlor, D.A., Lehtimäki, T., Li, J., Lichtenstein, P., Lichtner, P., Liewald, D.C., Madden, P.A., Magnusson, P.K.E., Mäkinen, T.E., Masala, M., McGue, M., Metspalu, A., Mielck, A., Miller, M.B., Montgomery, G.W., Mukherjee, S., Nyholt, D.R., Oostra, B.A., Palmer, L.J., Palotie, A., Penninx, Brenda W. J. H., Perola, M., Peyser, P.A., Preisig, M., Räikkönen, K., Raitakari, O.T., Realo, A., Ring, S.M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Rudan, I., Rustichini, A., Salomaa, V., Sarin, A.-P., Schlessinger, D., Scott, R.J., Snieder, H., Pourcain, B.S., Starr, J.M., Sul, J.H., Surakka, I., Svento, R., Teumer, A., Study, T.L.C., Tiemeier, H., Rooij, Frank J. A. van, van Wagoner, D.R., Vartiainen, E., Viikari, J., Vollenweider, P., Vonk, J.M., Waeber, G., Weir, D.R., Wichmann, H.-E., Widen, E., Willemsen, G., Wilson, J.F., Wright, A.F., Conley, D., Davey-Smith, G., Franke, L., Groenen, P.J.F., Hofman, A., Johannesson, M., Kardia, S.L.R., Krueger, R.F., Laibson, D., Martin, N.G., Meyer, M.N., Posthuma, D., Thurik, A.R., Timpson, N.J., Uitterlinden, A.G., van Duijn, C.M., Visscher, P.M., Benjamin, D.J., Cesarini, D., Koellinger, P.D. (2013): GWAS of 126,559 Individuals Identifies Genetic Variants Associated with Educational Attainment. *Science*. 340, 1467–1471

100. Rosen, T., Bosaeus, I., Tölli, J., Lindstedt, G., Bengtsson, B.-Å. (1993): Increased body fat mass and decreased extracellular fluid volume in adults with growth hormone deficiency. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*. 38, 63–71

101. Rotach, P. (2001): Teil D: Populationsgenetik, Skript zum Thema Forstgenetik. Zürich: ETH Zürich

102. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74, 5463–5467

103. Schmidt, E.M., Willer, C.J. (2015): Insights into blood lipids from rare variant discovery. *Current Opinion in Genetics & Development*. 33, 25–31

104. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr, Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404, 661–671

105. Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D. (2014): MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Meth.* 11, 361–362

106. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Kwitek, A.E., Sandstrom, D.W., Stone, E.M. (1993): The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 16, 325–332

107. Shi, H., Hayes, M., Kirana, C., Miller, R., Keating, J., Macartney-Coxson, D., Stubbs, R. (2012): TUFM is a potential new prognostic indicator for colorectal carcinoma. *Pathology.* 44, 506–512

108. Singh, A.S., Mulder, C., Twisk, J.W., van Mechelen, W., Chinapaw, M.J. (2008): Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes.Rev.* 9, 474–488

109. Slatkin, M. (2008): Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics.* 9, 477–485

110. Speliotes, E.K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G., Jackson, A.U., Lango Allen, H., Lindgren, C.M., Luan, J., Magi, R., Randall, J.C., Vedantam, S., Winkler, T.W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I.M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H.M., Weedon, M.N., Wheeler, E., Wood, A.R., Ferreira, T., Weyant, R.J., Segre, A.V., Estrada, K., Liang, L., Nemesh, J., Park, J.H., Gustafsson, S., Kilpelainen, T.O., Yang, J., Bouatia-Naji, N., Esko, T., Feitosa, M.F., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Smith, A.V., Welch, R., Zhao, J.H., Aben, K.K., Absher, D.M., Amin, N., Dixon, A.L., Fisher, E., Glazer, N.L., Goddard, M.E., Heard-Costa, N.L., Hoesel, V., Hottenga, J.J., Johansson, A., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S., Moffatt, M.F., Myers, R.H., Narisu, N., Perry, J.R., Peters, M.J., Preuss, M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Sandholt, C., Scott, L.J., Timpson, N.J., Tyrer, J.P., van Wingerden, S., Watanabe, R.M., White, C.C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D.I., Cooper, M.N., Jansson, J.O., Lawrence, R.W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H., Alibrandi, M.T., Almgren, P., Arnold, A.M., Aspelund, T., Atwood, L.D., Balkau, B., Balmforth, A.J., Bennett, A.J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R.N., Bergmann, S., Biebermann, H., Blakemore, A.I., Boes, T., Bonnycastle, L.L., Bornstein, S.R., Brown, M.J., Buchanan, T.A., Busonero, F., Campbell, H., Cappuccio, F.P., Cavalcanti-Proenca, C., Chen, Y.D., Chen, C.M., Chines, P.S., Clarke, R., Coin, L., Connell, J., Day, I.N., den Heijer, M., Duan, J., Ebrahim, S., Elliott, P., Elosua, R., Eiriksdottir, G., Erdos, M.R., Eriksson, J.G., Facheris, M.F., Felix, S.B., Fischer-Posovszky, P., Folsom, A.R., Friedrich, N., Freimer, N.B.,

Fu, M., Gaget, S., Gejman, P.V., Geus, E.J., Gieger, C., Gjesing, A.P., Goel, A., Goyette, P., Grallert, H., Grassler, J., Greenawalt, D.M., Groves, C.J., Gudnason, V., Guiducci, C., Hartikainen, A.L., Hassanali, N., Hall, A.S., Havulinna, A.S., Hayward, C., Heath, A.C., Hengstenberg, C., Hicks, A.A., Hinney, A., Hofman, A., Homuth, G., Hui, J., Igl, W., Iribarren, C., Isomaa, B., Jacobs, K.B., Jarick, I., Jewell, E., John, U., Jorgensen, T., Jousilahti, P., Jula, A., Kaakinen, M., Kajantie, E., Kaplan, L.M., Kathiresan, S., Kettunen, J., Kinnunen, L., Knowles, J.W., Kolcic, I., Konig, I.R., Koskinen, S., Kovacs, P., Kuusisto, J., Kraft, P., Kvaloy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lanzani, C., Launer, L.J., Lecoeur, C., Lehtimäki, T., Lettre, G., Liu, J., Lokki, M.L., Lorentzon, M., Luben, R.N., Ludwig, B., MAGIC, Manunta, P., Marek, D., Marre, M., Martin, N.G., McArdle, W.L., McCarthy, A., McKnight, B., Meitinger, T., Melander, O., Meyre, D., Midtjell, K., Montgomery, G.W., Morken, M.A., Morris, A.P., Mulic, R., Ngwa, J.S., Nelis, M., Neville, M.J., Nyholt, D.R., O'Donnell, C.J., O'Rahilly, S., Ong, K.K., Oostra, B., Pare, G., Parker, A.N., Perola, M., Pichler, I., Pietiläinen, K.H., Platou, C.G., Polasek, O., Pouta, A., Rafelt, S., Raitakari, O., Rayner, N.W., Ridderstråle, M., Rief, W., Ruukonen, A., Robertson, N.R., Rzehak, P., Salomaa, V., Sanders, A.R., Sandhu, M.S., Sanna, S., Saramies, J., Savolainen, M.J., Scherag, S., Schipf, S., Schreiber, S., Schunkert, H., Silander, K., Sinisalo, J., Siscovick, D.S., Smit, J.H., Soranzo, N., Sovio, U., Stephens, J., Surakka, I., Swift, A.J., Tammesoo, M.L., Tardif, J.C., Teder-Laving, M., Teslovich, T.M., Thompson, J.R., Thomson, B., Tonjes, A., Tuomi, T., van Meurs, J.B., van Ommen, G.J., Vatin, V., Viikari, J., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogel, C.I., Voight, B.F., Waite, L.L., Wallaschofski, H., Walters, G.B., Widen, E., Wiegand, S., Wild, S.H., Willemsen, G., Witte, D.R., Witteman, J.C., Xu, J., Zhang, Q., Zgaga, L., Ziegler, A., Zitting, P., Beilby, J.P., Farooqi, I.S., Hebebrand, J., Huikuri, H.V., James, A.L., Kahonen, M., Levinson, D.F., Macciardi, F., Nieminen, M.S., Ohlsson, C., Palmer, L.J., Ridker, P.M., Stumvoll, M., Beckmann, J.S., Boeing, H., Boerwinkle, E., Boomsma, D.I., Caulfield, M.J., Chanock, S.J., Collins, F.S., Cupples, L.A., Smith, G.D., Erdmann, J., Froguel, P., Gronberg, H., Gyllenstein, U., Hall, P., Hansen, T., Harris, T.B., Hattersley, A.T., Hayes, R.B., Heinrich, J., Hu, F.B., Hveem, K., Illig, T., Jarvelin, M.R., Kaprio, J., Karpe, F., Khaw, K.T., Kiemeny, L.A., Krude, H., Laakso, M., Lawlor, D.A., Metspalu, A., Munroe, P.B., Ouwehand, W.H., Pedersen, O., Penninx, B.W., Peters, A., Pramstaller, P.P., Quertermous, T., Reinehr, T., Rissanen, A., Rudan, I., Samani, N.J., Schwarz, P.E., Shuldiner, A.R., Spector, T.D., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A., Valle, T.T., Wabitsch, M., Waeber, G., Wareham, N.J., Watkins, H., Procardis Consortium, Wilson, J.F., Wright, A.F., Zillikens, M.C., Chatterjee, N., McCarroll, S.A., Purcell, S., Schadt, E.E., Visscher, P.M., Assimes, T.L., Borecki, I.B., Deloukas, P., Fox, C.S., Groop, L.C., Haritunians, T., Hunter, D.J., Kaplan, R.C., Mohlke, K.L., O'Connell, J.R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D.P., van Duijn, C.M., Wichmann, H.E., Frayling, T.M., Thorsteinsdottir, U., Abecasis, G.R., Barroso, I., Boehnke, M., Stefansson, K., North, K.E., McCarthy, M.I.,

Hirschhorn, J.N., Ingelsson, E., Loos, R.J. (2010): Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat.Genet.* 42, 937–948

111. Statistisches Bundesamt (2014a): Jeder zweie Erwachsene in Deutschland hat Übergewicht - Pressemitteilung Nr. 386 vom 05.11.2014

112. Statistisches Bundesamt (2014b): Mikrozensus -- Fragen zur Gesundheit - Körpermaße der Bevölkerung 2013
1–14

113. Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., Narechania, A. (2003): PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research.* 13, 2129–2141

114. Touma, M. (2016): Promotionsarbeit in Vorbereitung: Molekulargenetische Analyse am TUFM-Gen [Tu translation elongation factor mitochondrial gene] bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen

115. Uitenbroek, D.G. (1997): SISA-Binomial. Hilversum, Niederlande. Online-Publikation; <http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>. Zuletzt abgerufen am 09.01.2016

116. Underhill, P.A., Jin, L., Lin, A.A., Mehdi, S.Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R.W., Cavalli-Sforza, L.L., Oefner, P.J. (1997): Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 7, 996–1005

117. Valente, L., Shigi, N., Suzuki, T., Zeviani, M. (2009): The R336Q mutation in human mitochondrial EFTu prevents the formation of an active mt-EFTu.GTP.aa-tRNA ternary complex. *Biochim.Biophys.Acta.* 1792, 791–795

118. Valente, L., Tiranti, V., Marsano, R.M., Malfatti, E., Fernandez-Vizarra, E., Donnini, C., Mereghetti, P., Gioia, L. de, Burlina, A., Castellan, C., Comi, G.P., Savasta, S., Ferrero, I., Zeviani, M. (2007): Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu.

119. van der Sijde, M., Ng, A., Fu, J. (2014): Systems genetics: From GWAS to disease pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1842, 1903–1909
120. Vimalaewaran, K.S., Tachmazidou, I., Zhao, J.H., Hirschhorn, J.N., Dudbridge, F., Loos, R.J. (2012): Candidate genes for obesity-susceptibility show enriched association within a large genome-wide association study for BMI. *Hum.Mol.Genet.* 21, 4537–4542
121. Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. (2003): NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3688–3691
122. Voisin, S., Almén, M.S., Zheleznyakova, G.Y., Lundberg, L., Zarei, S., Castillo, S., Eriksson, F.E., Nilsson, E.K., Blüher, M., Böttcher, Y., Kovacs, P., Klovins, J., Rask-Ander sen, M., Schiöth, H.B. (2015): Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. *Genome Medicine*. 7, 103
123. Volckmar, A.L., Bolze, F., Jarick, I., Knoll, N., Scherag, A., Reinehr, T., Illig, T., Grallert, H., Wichmann, H.E., Wiegand, S., Biebermann, H., Krude, H., Fischer-Posovszky, P., Rief, W., Wabitsch, M., Klingenspor, M., Hebebrand, J., Hinney, A. (2012): Mutation screen in the GWAS derived obesity gene SH2B1 including functional analyses of detected variants. *BMC Med.Genomics*. 5, 65–74
124. Volckmar, A.L., Han, C.T., Pütter, C., Haas, S., Vogel, C.I., Knoll, N., Struve, C., Göbel, M., Haas, K., Herrfurth, N., Jarick, I., Grallert, H., Schürmann, A., Al-Hasani, H., Hebebrand, J., Sauer, S., Hinney, A. (2016): Analysis of Genes Involved in Body Weight Regulation by Targeted Re-Sequencing. *PLoS ONE*. 11, e0147904
125. Volckmar, A.-L. (2013): Promotionsarbeit: In depth analysis of obesity candidate genes in the chromosomal region 16p11.2 identified in genome-wide association studies
126. Volckmar, A.-L., Song, J.-Y., Jarick, I., Pütter, C., Göbel, M., Horn, L., Struve, C., Haas, K., Knoll, N., Grallert, H., Illig, T., Reinehr, T., Wang, H.-J., Hebebrand, J., Hinney, A. (2015): Fine Mapping of a GWAS-Derived Obesity Candidate Region on Chromosome 16p11.2.

127. Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. (1979): Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543–3557

128. Wandolski, M. (2010): Promotionsarbeit: Analyse des Fettsäureamidhydrolasegens bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen

129. Watson, P.E., Watson, I.D., Batt, R.D. (1979): Obesity indices. *Am.J.Clin.Nutr.* 32, 736–737

130. Weinberg, W. (1908): Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg.* 64, 368–382

131. Wells, J., Henkler, F., Leversha, M., Koshy, R. (1995): A mitochondrial elongation factor-like protein is over-expressed in tumours and differentially expressed in normal tissues. *FEBS Lett.* 358, 119–125

132. Welter, D., MacArthur, J., Morales, J., Burdett, T., Hall, P., Junkins, H., Klemm, A., Flicek, P., Manolio, T., Hindorff, L., Parkinson, H. (2014): The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Research.* 42, D1001-6

133. WHO (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Genf, Schweiz: World Health Organization. ISBN: 9241208945

134. WHO (2011): WHO | Waist Circumference and Waist–Hip Ratio. Zuletzt abgerufen am 10.03.2012

135. WHO (2016): Obesity and overweight. Fact sheet. Updated June 2016. Online-Publikation; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Zuletzt abgerufen am 06.07.16

136. Willer, C.J., Speliotes, E.K., Loos, R.J.F., Li, S., Lindgren, C.M., Heid, I.M., Berndt, S.I., Elliott, A.L., Jackson, A.U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H.N., McCarroll, S.A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J.C., Roccascaccia, R.M., Sanna, S., Scheet, P., Weedon, M.N., Wheeler, E., Zhao, J.H., Jacobs, L.C., Prokopenko, I., Soranzo, N., Tanaka, T., Timpson,

N.J., Almgren, P., Bennett, A., Bergman, R.N., Bingham, S.A., Bonnycastle, L.L., Brown, M., Burt, N.P., Chines, P., Coin, L., Collins, F.S., Connell, J.M., Cooper, C., Smith, G.D., Denison, E.M., Deodhar, P., Elliott, P., Erdos, M.R., Estrada, K., Evans, D.M., Gianniny, L., Gieger, C., Gillson, C.J., Guiducci, C., Hackett, R., Hadley, D., Hall, A.S., Havulinna, A.S., Hebebrand, J., Hofman, A., Isomaa, B., Jacobs, K.B., Johnson, T., Jousilahti, P., Jovanovic, Z., Khaw, K.-T., Kraft, P., Kuokkanen, M., Kuusisto, J., Laitinen, J., Lakatta, E.G., Luan, J., Luben, R.N., Mangino, M., McArdle, W.L., Meitinger, T., Mulas, A., Munroe, P.B., Narisu, N., Ness, A.R., Northstone, K., O'Rahilly, S., Purmann, C., Rees, M.G., Ridderstråle, M., Ring, S.M., Rivadeneira, F., Ruukonen, A., Sandhu, M.S., Saramies, J., Scott, L.J., Scuteri, A., Silander, K., Sims, M.A., Song, K., Stephens, J., Stevens, S., Stringham, H.M., Tung, Y.C.L., Valle, T.T., van Duijn, C.M., Vimalaswaran, K.S., Vollenweider, P., Waeber, G., Wallace, C., Watanabe, R.M., Waterworth, D.M., Watkins, N., Witterman, J.C.M., Zeggini, E., Zhai, G., Zillicks, M.C., Altshuler, D., Caulfield, M.J., Chanoock, S.J., Farooqi, I.S., Ferrucci, L., Guralnik, J.M., Hattersley, A.T., Hu, F.B., Jarvelin, M.-R., Laakso, M., Mooser, V., Ong, K.K., Ouwehand, W.H., Salomaa, V., Samani, N.J., Spector, T.D., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A.G., Wareham, N.J., Deloukas, P., Frayling, T.M., Groop, L.C., Hayes, R.B., Hunter, D.J., Mohlke, K.L., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D.P., Wichmann, H.-E., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Barroso, I., Abecasis, G.R., Hirschhorn, J.N. (2008): Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat.Genet.* 41, 25–34

137. Williams, J.F. (1989): Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Bio-Techniques.* 7, 762–769

138. Worix, V.L., Burkhart, W., Spremulli, L.L. (1995): Cloning, sequence analysis and expression of mammalian mitochondrial protein synthesis elongation factor Tu. *Biochimica et biophysica acta.* 1264, 347–356

139. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Day, I.N. (2001): An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29, e88

140. You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J., Anderson, O.D. (2008): BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics.* 9, 253–265

141. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372, 425–432

7 Anhang

7.1 Verwendete Sequenz von *TUFM* und Primerpositionen

Sämtliche Laborversuche wurden mit Daten des menschlichen Genoms nach hg19, NCBI 37 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/>) durchgeführt.

Forward-Primer, Besonderheit bei Fragment 5: neuer Forward-Primer

Reverse-Primer

Exon

>chromosome:GRCh37:16:28853132:28858329:-1

```
>CCTCACAGGGCCCAACACTGACTCCTACCCAGTTCATCTCCTCTCAGGGCTAGATGTCAG
GCTCTCCCTATGAAGTGGATACTACTATTCCCATTTTACAGATTAGAAAACAAAGTCTCA
GCGAAGAGGGAGGTACACTTCACCCCATCCCCGAAAGGCGTCCAGGACCTGGTCCCCCTA
CCTCCAGCTGCGGCAGAGGCGGCCAGATATCTCGCAAGACCCGCGTAGCGAGTCGGACTC
CGGGGGACTCGGGGTCTCTCTCTGCCGGGCCAGGAGGAGGTTCTCTGAGCAGTCGGAGCC
GCAGCTGCCTCCCGGAGCCCAGAGCCCCTCCCTCCGGGTCCGGCCTAGCCCGCCTGACTCC
CACTCTGATCACCTCCACAGCCCGCCGACCTGAGAACTACTACGCCCATGAGCCTTCGCG
GCGCCGGTGATTTAGGGGACGCTCCTCAGTGCCCCCTGCGACCGCCAGAGAGAACTACGT
TGCCCCCTCAGCCCGAGAGGCGCGAGTGTTGGAAAACCTCTCCATCATACTCCGCCCTCGA
GACACCAGCCCCCTCCATGACGTCTTCAGCCGCGCGCCGACGTCGGCTGAGACGGCCAT
AGACACTGGCGGCTAGAGGGGCCGACTTGCCCTCCAGCTCTAACTTCCGCCGGAAGT
GCCTTCCAGCCGAGGCGCCCTTCTTCTTGTGCGCTCGGGCTCCTGGTCCCGGTCCC
CGGTTACCGGGGCGCGAGT[ATGACCACAATGGCGGCCGCCACCCTGCTGCGCGCGACGCC
CCACTTCAGCGGTGAGTGGTCAGGGAGGGCGATGGCGGCCAGGAACACTTTGGGGGAGT
GGTAGGTGGCTGGGTTCGGTCTGACCCCTTCCCTGCCTGACTCCAAGCTTCGGTCCCCGGC
AGGTCTCGCCGCCGGCCGACCTTCTGCTGCAGGGTCTGTTGCGGCTGCTGAAAGCCCC
GGCATTGCCTCTCTTGTGCCGCGGCCTGGCCGTGGAGGCCAAGAAGACTTACGTGCGCGA
CAAGCCACATGTGAATGTGGGTACCATCGGCCATGTGGACCACGGAAGACCACGCTGAC
TGACGCCATCACGAAGAAGTGAGTGGGGTTGGGGCGTCCAGCAGCGCCCTATCTACTGATG
GGAACCTGGAGCCAGGGAGGCAAGGCCAGCAGAGTGCTGCTGAGGAGTTTACTGTGGCC
CCAAGAGCCCGAATTTGTGCGACAGGTGGATTGGGAGATGCAAGAGACAAATTTCTCCTG
AACAGGAAGAATTTGTGATCCACCAATGGCTTGGGGATCACAAAGTCGTGGGGAATGCT
CTGCAAGCAGAGGCTGTACCCTAAAGAAGTACAGGGCAGACCCTTAAGGCCCTCTAACA
TTTCTTTCTGACCCACAGTTCTCTCTGCTGGAAGAGTTAGAGATTGGAGGAGGTTATGTA
TTTAGGTGGGAGGGTTCAGGGGCGTGGTCTAAGCTCTGCCTCTAGCACTGGAACCTTAGC
TGAGAGGTGTGTTCTTTTCTCCTTTAGTTCTAGCTGAGGGAGGTGGGGCTAAGTTCAAG
AAGTACGAGGAGATTGACAATGCCCCGAGGAGCGAGCTCGGGGTATCACCATCAATGCG
GCTCATGTGGAGTATAGCACTGCCGCCGCCACTACGCCACACAGACTGCCCGGGTCAT
GCAGATTATGTTAAGTGAGGGTTGCTGGGACACTGGAGACAGGGCCAGAAGCTGCCTCT
TGTGAGGATAAATGTTAGGCTTGTGGGGAAGGAGATTAAGATATTCAGTGTTTGGGTATGA
```


CAGTTTTAACGGATAAATCAAGTCCAGTGAGCTTAGTGATTGCCTAGACACAGTAGGATG
CCGTTATTCAGCCTCCTGGGAGATAGTGGGAAAGAATGTTCTATCGCTCTGGAGCCAGCA
TGGCTTCAGCTCAGGTGCCAAACCCATCTTGTTTCCTCGGAATACTAAGTGAATGTCTAG
CATCCATTACATTCTGTGGGAACAGGGACTGGACAGGCATACCTCAGATGCTGTAGGTT
TGCTTCCAGACTACCACAATAAAGCAGGTCACAAATTTTTTGATTTCTCAGTGAAGTTAT
GTTTATATTATAGTTGACCCCTTGAACAATGCAGGGGTTAGGGGTGTCAGCCCTCCTCCAT
GCAGCCACAAATCCACATATAACTTGTTTTTGGAGATGGGGCCAGCTTTGTGCAGTGGCAG
TATCATAGCCAATGACTCCATGATGACTTGAAATATAATCAGCATTGGCAATTTTCGACG
GTCTCTATGGGGAGGCTGAACAAAGGGAAAAAAGAGATATAGGGTCTCACTGTCACCCA
GGCTGGGTGCGGTGGCACCATCCTAGCTCACTGCAGCCTTGGACTCCTGGGCTCAACCTT
GGTCTCCCCAACTGCTGGGATTAGAGGTGTAAGCTACCGTGTCTGGCTCCTCACATATAA
CTTGACTCCCCCAAATGTAACCTAGTAACCTGCTGCTGGCCAGAAGCCTCGCTGATAGCA
TACAAACACATACTTTGTGTGTTATATGTATTATATACTGTATTCTTAAACTAGAGAGT
GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGATTGAGGTGGGTGGA
TCACAAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACAT<

7.2 Abbildungsverzeichnis

Für jede in dieser Arbeit verwendete Abbildung wurde das schriftliche Einverständnis des Verlags zur Verwendung im Rahmen dieser Promotion eingeholt.

Abbildung 1.1 BMI-Perzentilen für männliche Kinder und Jugendliche bis zum einem Alter von 18 Jahren. Eingezeichnet sind die verschiedene Stufen von Unter- bis Übergewicht (Abbildung unverändert übernommen aus Kromeyer-Hauschild et al. 2001, ©Springer-Verlag 2001, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt). 6

Abbildung 1.2 Prävalenz (in %) für Übergewicht und Adipositas in der Kindheit in den USA und 8 weiteren Ländern über einen Zeitraum seit 1972 (Abbildung übernommen und mit deutschen Achsenbeschriftungen versehen aus Lobstein et al. 2015., ©The Lancet 2015, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt) 8

Abbildung 1.3 Dargestellt ist die chromosomale Region 16p11.2 und der SNP rs7359397, korreliert mit dem BMI ($-\log_{10} p$). Die Rekombinationsrate ist blau dargestellt. Mehrere genomische Loci liegen in hohem LD ($r^2 > 0.8$, rote Punkte) zu diesem SNP, darunter *SH2B1* und *TUFM* (roter Kreis, Abbildung selbst erstellt nach Speliotes et al. 2010 durch die Software „LocusZoom“ [<http://locuszoom.sph.umich.edu/locuszoom/>], Pruim et al. 2010, mittels der Daten „hapMap/hg18 Phase II CEU“ [<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>]). 19

Abbildung 2.1 Absorptions-Zeit-Chromatogramm (untere Bildhälfte) und schematische Darstellung der Entstehung der Peaks. Nach Denaturierung lagern sich die Einzelstränge zu Hetero- oder Homoduplices zusammen. Die Heteroduplices lösen sich aufgrund geringerer elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Säule früher und werden früher detektiert (Abbildung entnommen und mit deutscher Achsenbeschriftung versehen nach Frueh und Noyer-Weidner 2003, ©2003 Walter de Gruyter Verlag, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt). 38

Abbildung 2.2 Absorptions-Zeit-Chromatogramm in Abhängigkeit von der idealen Schmelztemperatur. Zwischen 58°C und 54°C eluiert die heterozygote Variante gut abgrenzbar vom Homoduplex des Wildtyps (für diese Grafik wurde eine Punktmutation Adenin zu Guanin an Position 168 einer 208 bp langen Sequenz betrachtet, Abbildung entnommen, mit Temperaturangaben und deutschen Achsenbeschriftungen versehen nach Frueh und Noyer-Weidner 2003, ©2003 Walter de Gruyter Verlag, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt). 39

Abbildung 2.3 Theoretischer Ablauf einer ARMS-PCR. Es liegen 2 Allele vor, die durch die spezifischen inneren Primer (blau, pink) unterschieden werden sollen. Die äußeren Primer

(violett, türkis) legen die Länge der Fragmente fest. Nach Durchführung einer PCR erhält man ein spezifisches Bandenmuster (unterer Kasten), aus dem man erkennt, welche Allele in dem Reagenz vorhanden waren (Abbildung entnommen und mit deutschen Beschriftungen versehen aus Ye et al. 2001, ©2001 Oxford University Press, Erlaubnis zur Verwendung beim Verlag eingeholt).44

Abbildung 3.1 Übersicht über alle in dieser Arbeit detektierten SNPs und ihre Position in *TUFM* (vertikale schwarze Linien). Exons sind durch blaue Kästen dargestellt, Introns durch die horizontal verlaufende blaue Linie. Nicht kodierende exonische Bereiche vor dem Start- bzw. nach dem Stopp-Codon sind durch nicht ausgefüllte Kästen dargestellt. Funktionell wichtige Bereiche sind farblich hervorgehoben (entnommen und modifiziert aus Volckmar et al. 2015 nach dem online-verfügbarem Anhang „S3 Fig. Mutated positions in the obesity candidate genes of chr16p11.2 and regional overview“, © 2015 Volckmar, Struve et al.).50

Abbildung 3.2 dHPLC-Analyse Exon 3 bei einer Temperatur von 57,8°C.52

Abbildung 3.3 Sequenzanalyse der Variante mit der rs-Nummer rs8061877 (die dargestellten Zahlen dienen der Orientierung innerhalb einer Sequenz und sind für jede Sequenzierung individuell). Dargestellt ist der Bereich von Chromosom 16, Position 28,856,815 bis 28,856,822, mit dem SNP an Position 28,856,819 (nach hg19, NCBI 37).53

Abbildung 3.4 dHPLC-Analyse Exon 7 bei einer Temperatur von 61,0°C.54

Abbildung 3.5 Sequenzanalyse der Variante mit der rs-Nummer rs61737565 (die dargestellten Zahlen dienen der Orientierung innerhalb einer Sequenz und sind für jede Sequenzierung individuell). Dargestellt ist der Bereich von Chromosom 16, Position 28,855,521 bis 28,855,527, mit dem SNP an Position 28,855,522 (nach hg19, NCBI 37). ...54

Abbildung 3.6 dHPLC-Analyse Exon 7 bei einer Temperatur von 61,5°C.55

Abbildung 3.7 Sequenzanalyse der Variante mit der rs-Nummer rs4788099. (die dargestellten Zahlen dienen der Orientierung innerhalb einer Sequenz und sind für jede Sequenzierung individuell). Dargestellt ist der Bereich von Chromosom 16, Position 28,855,723 bis 28,855,730, mit dem SNP an Position 28,855,727 (nach hg19, NCBI 37).56

Abbildung 3.8 ARMS-PCR des SNPs rs8061877 (Ausschnitt eines 2,5%-Agarosegels versetzt mit Ethidiumbromid. Banden D und E = Wildtyp; Banden A und C = heterozygote Varianten; Bande B = homozygote Variante. Ein DNA-Längenmarker (1) lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften der ARMS-PCR und ihrer Primer siehe Tabelle 2.22).57

Abbildung 3.9 RFLP-Analyse des SNPs rs61737565 mit dem Enzym *Cac8I* (auf einem 3,0%-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid. Banden D und E = Wildtyp; Banden A und F = heterozygote Varianten; Banden B, C und H = homozygote Varianten. Ein DNA-Längenmarker (1) lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften des Enzyms siehe Tabelle 2.20).57

Abbildung 3.10 RFLP-Analyse des SNPs rs4788099 mit dem Enzym *PfI*FI (auf einem 2,5%-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid. Banden C und D = Wildtyp; Banden E und F = heterozygote Varianten; Banden A, B und G = homozygote Varianten. Ein DNA-Längenmarker lief zur Orientierung in der rechten Geltasche mit, die Positionen der Schnittstellen sind beschriftet. Für die genauen Eigenschaften des Enzyms siehe Tabelle 2.20).58

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1.1 Klassifikation der Adipositas anhand des Body-Mass-Indexes mit Angabe des Risikos für Begleiterkrankungen (modifiziert nach WHO 2000)..... | 5 |
| Tabelle 1.2 Taillenumfang und Risiko für Komorbidität (nach Lean et al. 1995) | 7 |
| Tabelle 2.1 Phänotypen der 95 Individuen des Mutationsscreenings (nach Volckmar et al. 2012; Volckmar 2013) | 25 |
| Tabelle 2.2 Auflistung der verwendeten Geräte | 25 |
| Tabelle 2.3 Auflistung der verwendeten Chemikalien..... | 26 |
| Tabelle 2.4 Verwendete Puffer für die DNA-Extraktion..... | 28 |
| Tabelle 2.5 Verwendete Standardpuffer..... | 28 |
| Tabelle 2.6 Verwendete Puffer für die dHPLC | 28 |
| Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Laufgele für die SSCP | 29 |
| Tabelle 2.8 Verwendeter Auftragspuffer für die SSCP | 29 |
| Tabelle 2.9 Silberfärbung, verwendete Chemikalien und Reaktionsschritte | 29 |
| Tabelle 2.10 Verwendete Enzyme | 30 |
| Tabelle 2.11 Standardreaktionsansatz für eine PCR..... | 34 |
| Tabelle 2.12 Standardreaktionsbedingungen für eine PCR..... | 34 |
| Tabelle 2.13 Exons und daraus resultierende Fragmente mit ihrer Länge in bp von <i>TUFM</i> (die fettgedruckten Fragmente und Exons wurden im Rahmen dieser Arbeit betrachtet)..... | 35 |
| Tabelle 2.14 Ideale MgCl ₂ -Bedingungen und Annealing-Temperaturen der Fragmente | 35 |
| Tabelle 2.15 Verdau für die SSCP durch das Enzym <i>BccI</i> für <i>TUFM</i> Exon 3 | 37 |
| Tabelle 2.16 Schnittstelle (rot markiert), verwendeter Puffer und Restriktionsbedingungen des Enzyms <i>BccI</i> für den Verdau für die SSCP von <i>TUFM</i> Exon 3 | 37 |
| Tabelle 2.17 Laufbedingungen für <i>TUFM</i> Exon 3..... | 37 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.18 Verwendete Programme und ideale Temperaturen für die Analyse von Fragmenten in <i>TUFM</i> durch das WAVE®-System | 41 |
| Tabelle 2.19 Restriktions- und Auftragsbedingungen der verwendeten Enzyme zur RFLP .. | 43 |
| Tabelle 2.20 Verwendete Enzyme zur RFLP mit Schnittstellen (rot markiert) und den resultierenden Fragmentlängen in Basenpaaren (Bp) des Wildtyps und der Variante (ein weiteres Fragment mit einer Länge von 52 bp bei der Variante rs61737565 durch das Enzym <i>Cac8I</i> ist nicht berücksichtigt, da dieses Fragment nur schwer sicher und reliabel mittels Gelelektrophorese zu erkennen gewesen wäre)..... | 43 |
| Tabelle 2.21 Reaktionsbedingungen der ARMS-PCR für <i>TUFM</i> Exon 3 Variante rs8061877 | 46 |
| Tabelle 2.22 Verwendete ARMS-PCR-Primer für Fragment 3 (rs8061877 C>T) und Länge der Primer (i = inner-Primer, o = outer-Primer, F = Forward, R = Reverse). Die Basen-Mismatches zur Erhöhung der Allelspezifität sind blau gekennzeichnet. Gen-Sequenz und Startpositionen der einzelnen Primer in <i>TUFM</i> nach hg19, NCBI 37 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/data/). | 46 |
| Tabelle 3.1 Detektierte und in dieser Arbeit betrachtete SNPs in <i>TUFM</i> (mit Angabe des Exons, des Fragments, der rs-Nummer, der absoluten und prozentualen Häufigkeiten der Allele, der mittleren Allelfrequenz (MAF) absolut sowie prozentual, und der zur Detektion genutzten laborexperimentellen Methode; insgesamt wurden 95 Individuen genotypisiert). . | 51 |
| Tabelle 3.2 Darstellung der absoluten und prozentualen Häufigkeiten der im Screening von <i>TUFM</i> detektierten SNPs mit Angabe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (insgesamt wurden 95 Individuen genotypisiert; die Berechnungen erfolgten zuerst selbst und wurden anschließend mit der Software „Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 2 Alleles“ überprüft [http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html]). | 52 |
| Tabelle 3.3 Darstellung der im Screening von <i>TUFM</i> detektierten SNPs (bei insgesamt 95 Individuen) gegenüber der CEU-Population aus dem <i>1000 genomes</i> Projekt, die in dieser Arbeit als normalverteilte Kontrollgruppe genommen wurde (insgesamt 99 Individuen). Gezeigt sind jeweils die absoluten und prozentualen Häufigkeiten der Allele und ihre mittlere Allelfrequenz (MAF)..... | 58 |
| Tabelle 3.4 SNPs und ihre funktionelle Relevanz nach einer <i>in silico</i> Analyse durch das Programm „Mutationtaster 2“ (http://mutationtaster.org/) | 59 |

7.4 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| A | Adenin |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| AGRP | Agouti-related protein |
| APOB48R | Apolipoprotein B48-Rezeptor |
| ARC | Nucleus arcuatus |
| ARMS-PCR | Allelspezifische PCR |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMI | Body Mass Index |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| CART | Cocain- und Amphetamin-regulierendes Transkript |
| CCK | Cholezystokinin |
| CEU | Utah residents with Northern and Western European ancestry |
| CNV | Kopienzahlvarianten |
| CRH | Corticotropin-freisetzendes Hormon |
| d | Tag |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| dHPLC | denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| engl. | englisch |
| Frg. | Fragment |
| FTO | Fat mass and obesity-associated protein |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GIP | Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid |
| GLP-1 | Glucagon-like-peptide 1 |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| IQ | Intelligenzquotient |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| kJ | Kilojoule |
| LD | Kopplungsungleichgewicht |
| LHA | lateraler Hypothalamus |

| | |
|---------|--|
| LoF | Loss-of-function-Mutation |
| m | Meter |
| MAF | Mittlere Allelfrequenz |
| MCH | Melanin-konzentrierendes Hormon |
| min | Minuten |
| MSH | Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| ncRNAs | non-protein-coding RNAs |
| NPY | Neuropeptid Y |
| nt | Nukleotide |
| NTS | Nucleus tractus solitarii |
| OXM | Oxyntomodulin |
| PC-1 | Proprotein-Convertase 1 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PVN | Nucleus paraventricularis |
| PWS | Prader-Willi-Syndrom |
| PYY | Peptid-Tyrosin-Tyrosin |
| RCLB | Red cell lysis buffer |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SH2B1 | Src-homologes-2B-Adapter Protein-1 |
| SSCP | Einzelstrangkonnformationsanalyse |
| SULT1A1 | Sulfotransferase 1A Mitglied 1 |
| SULT1A2 | Sulfotransferase 1A Mitglied 2 |
| SULT1A3 | Sulfotransferase 1A Mitglied 3 |
| T | Thymin |
| TRH | Thyreotropin-freisetzendes Hormon |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TUFM | Tu translation elongation factor mitochondrial |
| VIP | vasoaktives intestinales Polypeptid |
| VMH | Nucleus ventromedialis |
| WHO | World Health Organisation |
| WHR | waist-to-hip-ratio |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anke Hinney für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe zu diesem spannenden Thema forschen zu dürfen und für ihre fortwährende Unterstützung, die mir stets eine große Hilfe war. Ihre Tür stand immer offen und ihre exzellente Betreuung war ausschlaggebend, dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte. Danke!

Ich bedanke mich ebenfalls bei dem gesamten Laborteam, bei Sigi und Jitka, die einen großen Anteil an den gelungenen Versuchen haben, und bei Anna-Lena und Nadja für ihre Hilfe und ihren Rat an schwierigen Tagen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Mitstreiterin Maria Touma geb. Göbel, mit der ich diese Arbeit zusammen vollenden konnte. Anne Spieker und Helena Straub danke ich für ihre Hilfe bei Fragen, die die Statistik, das Kollektiv und das Verfassen einer Doktorarbeit betrifft. Ihr habt mir sehr geholfen.

Ohne meine Familie, meine Tante Heidi und meine Freundin hätte ich diese Leistung nicht erbringen können. Ich bedanke mich für eure Unterstützung, eure Geduld und euer Vertrauen in mich und meinen Weg. Danke, dass ich fortwährend auf euch zählen konnte und ihr mich nie fallen lasst.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten